

Aus dem Institut für Immunologie der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gert Riethmüller

**Gene-Targeting zur Herstellung einer
IgE überexprimierenden Maus**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christian Stöberl

aus

Bad Reichenhall

2003

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gert Riethmüller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Przybilla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Enders

Prof. Dr. med. R. G. H. Baumeister

Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. rer. nat. Philipp Yu

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2003

INHALTSVERZEICHNIS

| ABKÜRZUNGEN | SEITE |
|----------------------------------|---|
| A | |
| EINLEITUNG | 1 |
| B | |
| MATERIAL UND METHODEN | 9 |
| 1. | Material 9 |
| 1.1. | Chemikalien 9 |
| 1.2. | Standard-Puffer, Lösungen und Medien 9 |
| 1.3. | DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen 13 |
| 1.4. | Plasmide 13 |
| 1.5. | Bakterien 13 |
| 1.6. | PCR 13 |
| 1.7. | Zelllinien 14 |
| 1.8. | Mausstämme 14 |
| 1.9. | Antikörper 14 |
| 1.10. | Computerprogramme 16 |
| 2. | Methoden 16 |
| 2.1. | Arbeiten mit DNA 16 |
| 2.1.1. | Transformation von Bakterien 16 |
| 2.1.2. | Präparative Isolierung von Plasmid-DNA („Maxipräp“) 17 |
| 2.1.3. | Analytische Isolierung von Plasmid-DNA („Minipräp“) 17 |
| 2.1.4. | Agarosegel-Elektrophorese von DNA 18 |
| 2.1.5. | Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegel 18 |
| 2.1.6. | Ligation von DNA-Fragmenten 19 |
| 2.1.7. | Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase 19 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.1.8. | Auffüllen von überhängenden 5'-Enden mit dem Klenow-Fragment | 19 |
| 2.1.9. | Auffüllen von überhängenden 3'-Enden mit der T4-Polymerase | 20 |
| 2.1.10. | Sequenzieren | 20 |
| 2.1.11. | Konzentrationsbestimmung von DNA | 21 |
| 2.1.12. | Isolierung von DNA aus Mäuseschwanzspitzen | 21 |
| 2.1.13. | Präparation genomischer eukaryontischer DNA | 22 |
| 2.1.14. | Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen | 22 |
| 2.1.15. | Transfer von DNA-Fragmenten auf Membranen durch Kapillarwirkung | 23 |
| 2.1.16. | Hybridisierung membrangebundener DNA-Fragmente mit radioaktiv markierten DNA-Sonden | 23 |
| 2.1.17. | Identifizierung von Inserts in Bakterienkolonien durch in-situ-Lyse und Transfer von DNA auf Membranen (colony screen) | 24 |
| 2.2. | Arbeiten mit RNA | 25 |
| 2.2.1. | Isolation von RNA aus Gewebe und Zellen | 25 |
| 2.2.2. | Kontrolle der Integrität der RNA mittels Agarose-Gel-Elektrophorese | 25 |
| 2.2.3. | Reverse Transkription von RNA in cDNA | 26 |
| 2.2.4. | Quantitative PCR (QPCR) | 26 |
| 2.3. | Zellkultur | 29 |
| 2.3.1. | Gewinnung Embryonaler Fibroblasten | 29 |
| 2.3.2. | Kultur Embryonaler Fibroblasten | 30 |
| 2.3.3. | ES-Zell-Kultur | 30 |
| 2.3.4. | Gentransfer in ES-Zellen | 30 |
| 2.3.5. | Selektion von elektroporierten ES-Zellen | 31 |
| 2.3.6. | Isolation von einzelnen ES-Zellklonen | 31 |
| 2.3.7. | Nachweis der Homologen Rekombination in transfezierten ES-Zellen mittels PCR | 32 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.3.8. | Blastozysten-Injektion und Reimplantation von Blastozysten | 33 |
| 2.4. | Fixierung und Peroxidasefärbung von Zellen auf Objektträger | 34 |
| 2.5. | Isolierung von Milzzellen der Maus | 34 |
| 2.6. | Gewinnung von Serum aus dem Blut von Mäusen | 34 |
| 2.7. | Erythrozytenlyse | 35 |
| 2.8. | FACS-Analyse von Zellen aus Organen und Zellkultur | 36 |
| 2.9. | Nachweis von Antikörper mit ELISA | 36 |
| 2.10. | Bestimmung der IFN- γ - und IL-4-Konzentration mittels Sandwich-ELISA | 37 |
| 2.11. | Immunisierung | 38 |
| C | ERGEBNISSE | 40 |
| 1. | Herstellung der IgE-knock-in-Mäuse | 40 |
| 1.1. | Grundlegendes Prinzip der homologen Rekombination und Begriffserklärung | 40 |
| 1.2. | Überblick über die grundlegende Strategie des IgE-knock-in | 40 |
| 1.3. | Klonierung des Testarmes des IgE-knock-in | 42 |
| 1.4. | Klonierung des IgE-knock-in-Konstruktes | 43 |
| 1.5. | Überprüfung der drei loxP-Sites auf ihre Funktionalität | 47 |
| 1.6. | Transformation des Konstruktes in ES-Zellen und PCR-Screen | 49 |
| 1.7. | Überprüfung der korrekten Integration des Konstruktes in das Genom der Maus mittels Southern-Blot | 51 |
| 1.8. | Blastozysteninjektion und Geburt chimärer Mäuse | 53 |
| 1.9. | Identifizierung der genetisch veränderten Tiere | 54 |
| 2. | Phänotypische Analyse der (heterozygoten!) IgE-knock-in-Mäuse | 56 |
| 2.1. | Bestimmung der Immunglobuline im Serum von unbehandelten IgE-knock-in-Mäusen | 56 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.2. | In-vitro-Stimulation von Milzzellen aus IgE-knock-in-Mäusen | 57 |
| 2.3. | Immunisierung mit thymusabhängigen Antigenen | 61 |
| 2.3.1. | Immunisierung mit Ovalbumin (OVA) und komplettem Freund'schen-Adjuvans (CFA) | 62 |
| 2.3.2. | Immunisierung mit DNP-KLH und Aluminiumhydroxid (Alum) | 64 |
| 2.4. | Anaphylaxie bei IgE-knock-in-Mäusen | 66 |
| 2.4.1. | Aktive kutane Anaphylaxie (ACA) in IgE-knock-in-Mäusen | 66 |
| 2.4.2. | Systemische Anaphylaxie | 69 |
| 2.5. | Analyse des Zytokinprofiles von Milzzellen | 73 |
| 2.5.1. | Analyse des Zytokinprofiles von Milzzellen mittels QPCR | 74 |
| 2.5.1.1. | Bestimmung von IFN- γ | 74 |
| 2.5.1.2. | Bestimmung von IL-4 | 77 |
| 2.5.2. | Analyse des Zytokinprofiles von Milzzellen mittels intrazellulärem FACS | 80 |
| 2.5.2.1. | Färbung mit anti-IFN- γ | 81 |
| 2.5.2.2. | Färbung mit anti-IL-4 | 85 |
| 2.5.3. | Analyse des Zytokinprofiles von Milzzellen nach 72 h in-vitro-Stimulation mittels Zytokin-ELISA | 91 |
| 2.5.3.1. | Bestimmung von IFN- γ im Überstand von stimulierten Milzzellen | 91 |
| 2.5.3.2. | Bestimmung von IL-4 im Überstand von stimulierten Milzzellen | 92 |
| 2.6. | Analyse von Leukozyten auf unterschiedliche Oberflächenmarker mittels FACS | 93 |
| 2.6.1. | Mastzellen bzw. Mastzellvorläufer in WT- und IgE-knock-in-Mäusen | 93 |
| 2.6.2. | Nachweis der vermehrten IgE-Produktion durch Bindung von IgE an den IgE-low-affinity-receptor (CD23) | 95 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.6.3. | Nachweis einer vermehrten CD23-Expression im Knochenmark von IgE-knock-in-Mäusen | 97 |
| 2.6.4. | Nachweis von vermehrt CD4/CD25 ⁺ -Milzzellen in IgE-knock-in-Mäusen | 98 |
| 2.6.5. | Färbung von Milzzellen und Thymuszellen mit anti-CD4/anti-CD8 | 99 |
| D | DISKUSSION | 101 |
| 1. | Einleitung | 101 |
| 2. | Herstellung von Mäusen, die spezifisches IgE überexprimieren | 103 |
| 3. | IgE-Titer in unbehandelten Mäusen | 105 |
| 4. | In-vitro-Stimulation | 107 |
| 5. | Immunisierung | 110 |
| 6. | Anaphylaxie | 112 |
| 6.1. | Aktive kutane Anaphylaxie | 112 |
| 6.2. | Systemische Anaphylaxie | 113 |
| 7. | Zytokinprofil | 114 |
| 8. | T-Zell-Antwort | 116 |
| 9. | Nachweis einer IgE ⁺ /B220 ⁻ -Zellpopulation | 117 |
| 10. | Eingriffsmöglichkeiten bei allergischen Erkrankungen | 118 |
| 11. | Vor- und Nachteile dieses Mausmodelles | 120 |
| 12. | Ausblick | 122 |
| E | ZUSAMMENFASSUNG | 123 |
| F | LITERATURVERZEICHNIS | 126 |
| G | DANKSAGUNG | 139 |
| H | LEBENS LAUF | 140 |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|-------------------|--|
| °C | Temperatur in Grad Celsius |
| A | Adenin |
| AB | Antibiotikum |
| Abb. | Abbildung |
| ACA | Aktive kutane Anaphylaxie |
| Ag | Antigen |
| AK | Antikörper |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APC | Allophycocyanin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| Bq | Bequerel |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| C | Cytosin |
| CD | “Cluster of Differentiation” |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CIP | “calf intestinal phosphatase” |
| cpm | “counts per minute” (Impulse pro Minute) |
| cre | “cyclization recombination” |
| dATP | Desoxy-Adenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxy-Cytosintriphosphat |
| DEPC | Diethylaminoethan |
| dGTP | Desoxy-Guanosintriphosphat |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DMEM | Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNP | Dinitrophenol |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| dTTP | Desoxy-Thymidintriphosphat |

| | |
|---------------------------------------|---|
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EF | embryonale Fibroblasten |
| ELISA | “Enzyme linked immunosorbent assay” |
| ES | embryonale Stammzellen |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | “fluorescent activated cell sorter” |
| FCS | fötales Kälber-Serum |
| FITC | Fluoreszein Isothiocyanat |
| g | Gravitationsbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ |
| G | Guanin |
| HRP | “horseradish peroxidase” |
| i. p. | intraperitoneal |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| kb | Kilobasenpaare |
| kin | knock in |
| KLH | Keyhole-Limpet-Hämocyanin |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertoni-Nährmedium |
| LIF | Leukemia inhibitory factor |
| loxP | “locus of X-over of Bacteriophage P1” |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| Lsg. | Lösung |
| M | molar |
| mAB | “monoclonal antibody” |
| MACS | “magnetic separation” |
| min | Minute(n) |
| MOPS3-(N-Morpholino)propansulfonsäure | |
| mRNA | Botenribonukleinsäure |
| neo | Neomycin-Resistenz-Kassette |
| OD _x | optische Dichte bei Wellenlänge x nm |

| | |
|--------|--|
| OVA | Ovalbumin |
| PBS | Phosphatgepufferte Salinelösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PNPP | p-Nitro-Phenyl-Phosphat |
| Primer | kurzes Oligonukleotid |
| Probe | Hybridisierungssonde |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehung pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| S | Svedberg |
| s. c. | sub kutan |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec. | Sekunden |
| SPF | “specific pathogen free” |
| SSC | Natriumchlorid-Natriumzitat-Lösung |
| T | Thymin |
| Taq | Thermus aquaticus |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA-Lösung |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TFB | Transformationspuffer |
| tk | Thymidinkinase |
| TMP | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinedihydrochlorid |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | Unit, enzymatische Einheit |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolettes Licht |
| v/v | Volumen pro Gesamtvolumen |
| w/v | Gewicht pro Gesamtvolumen |
| WT | Wildtyp |

A EINLEITUNG

Allergische Erkrankungen wie Asthma bronchiale, Heuschnupfen, allergische Ekzeme oder Nahrungsmittelallergien haben in den letzten Jahren annähernd epidemieartige Ausmaße erreicht - mit den entsprechenden Folgen. So sind nach Schätzungen weltweit 155 Millionen Personen von allergischem Asthma betroffen (Cookson et al., 1999). Unter allergischen Ekzemen leiden 10 - 20 % der Kinder in der westlichen Welt, Tendenz ansteigend (Sampson et al., 1990; Schulz-Larsen et al., 1993). Die Behandlungskosten allergischer Erkrankungen betragen in der Bundesrepublik Deutschland nach einer Schätzung aus dem Jahre 1996 jährlich circa 2,5 Milliarden € (Nowak et al., 1996).

Eine Schlüsselrolle im Verständnis der Pathogenese der Allergie nehmen die T-Helferzellen ein. Sie werden aufgrund ihres Zytokinexpressionsmusters in verschiedene Subtypen unterteilt - T_{H1} und T_{H2} .

Infektionen - vor allem intrazelluläre Parasiten - induzieren natürliche Killerzellen und eine T_{H1} dominierte Immunantwort. Diese ist charakterisiert durch IL-2, TNF- α und vor allem IFN- γ . IFN- γ fördert die Elimination des Antigens durch Aktivierung von Makrophagen, durch vermehrte Synthese von komplementbindenden, opsonierenden Antikörpern und durch Induktion von zytotoxischen T-Zellen. Der für die T_{H1} -Antwort charakteristische Antikörper ist IgG_{2a} (Abbas et al., 1997).

Dagegen führen Wurm- und viele andere Parasitenerkrankungen früh zur IL-4 Freisetzung und damit zur T_{H2} -Antwort. Weitere T_{H2} typische Zytokine sind IL-3, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13. T_{H2} -Zellen rekrutieren eosinophile Granulozyten und fördern die Bildung von IgG₁ und IgE. IL-4 (früher „T cell derived B cell growth factor 1“ genannt) und IL-13 sind für den Klassensprung zum IgE verantwortlich (Snapper et al., 1988).

Diese wechselseitigen Beziehungen zwischen den T-Helferzell-Subpopulationen führte zur Formulierung der „Hygienehypothese“ als Versuch, die Allergieentstehung pathophysiologisch zu erklären (Strachan, 1989; Strachan, 2000; Braun-Fahrlander et al., 2002; Weiss, 2002). Sie basiert u. a. auf folgenden Beobachtungen:

Die Wiedervereinigung Deutschlands ermöglichte Untersuchungen an genetisch sehr ähnlichen Populationen, jedoch mit unterschiedlichem Lebensstandard. So war in

München und Hamburg eine signifikant höhere Prävalenz von allergischen Erkrankungen zu verzeichnen als in Leipzig und Erfurt (von Mutius et al., 1992). Dies überraschte sehr, denn Luftverschmutzung, die in der ehemaligen DDR wesentlich stärker auftrat, und als Folge davon Infektionen, wurden bis vor wenigen Jahren als wichtiger Risikofaktor für allergische Erkrankungen angesehen.

Im Immunsystem des Neugeborenen überwiegen Ag-spezifische T_{H2} -Antworten und deshalb werden Umwelteinflüsse benötigt, die die Immunantwort in Richtung T_{H1} lenken (Tang et al., 1994; Bjorksten, 1999). Diese Umwelteinflüsse - bestimmte Infektionen - konnten anhand von Studien mit Zwillingen, die sich das Kinderzimmer teilten (von Mutius et al., 1994), oder von Kindern, die früh in eine Tagesstätte kamen (Kramer et al., 1999; Ball et al., 2000), dingfest gemacht werden. Bei Neugeborenen, deren Mütter in der Schwangerschaft und während des Stillens probiotische Kulturen zu sich nahmen, zeigte sich eine Halbierung der Inzidenz an Atopischer Dermatitis (Kalliomäki et al., 2001). Ebenso fand man bei Kindern von Landwirten signifikant weniger häufig Allergien als in einer vergleichbaren Population von Kindern aus Städten (Braun-Fahrlander et al., 1999; Braun-Fahrlander et al., 2002). Shirakawa et al. (1997) konnte zeigen, daß Kinder, die mit *Mycobacterium tuberculosis* in Kontakt kamen - ein infektiöses Agens, das eine T_{H1} -Immunantwort induzieren kann -, signifikant weniger häufig an Allergie erkrankten. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fand sich eine umgekehrte Proportionalität zwischen T_{H1} bedingten Autoimmunkrankheiten, wie Multiple Sklerose oder Diabetes mellitus Typ I und Allergie (Oro et al., 1996; Douek et al., 1999).

Man folgerte aus dem Genannten, daß Stimuli, die eine T_{H1} -Antwort favorisieren, vor Allergieentstehung schützen. Die $IFN-\gamma$ -Produktion der T_{H1} -Zellen scheint die proallergischen T_{H2} -Zellen zu hemmen.

Diese Theorie als Erklärung für ein allgemein pathogenetisches Konzept allergischer Erkrankungen scheitert aber an deren großer Heterogenität. Bei allergischer Rhinitis und Nahrungsmittelallergien dominiert die frühe Phase der Typ I - Reaktion (nach Coombs and Gell, 1963), wohingegen die protrahierte Entzündungsreaktion bei der Entstehung von chronischem allergischem Asthma eine entscheidende Rolle spielt. Allergischer Hautausschlag - z. B. die allergische Kontaktdermatitis - ähnelt in seinem

Erscheinungsbild der T-Zell induzierten Typ IV - Reaktion (nach Coombs and Gell, 1963).

Außerdem bleibt ungeklärt, warum der eine „nur“ an allergischer Rhinitis, der andere jedoch an lebensbedrohlichem allergischem Asthma erkrankt.

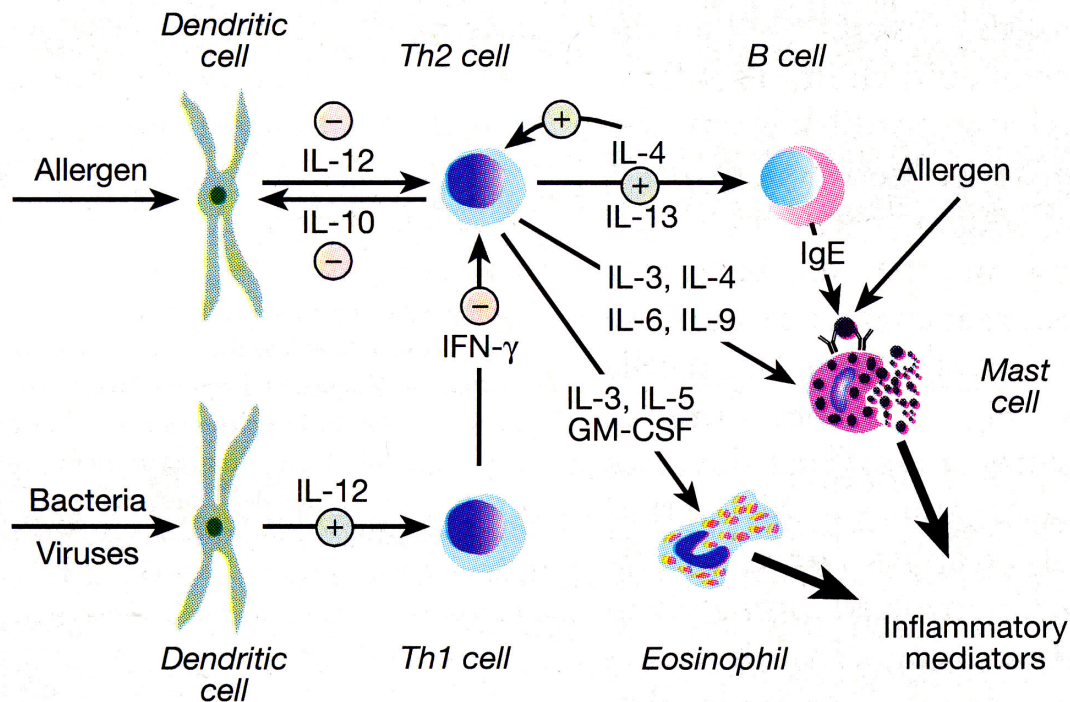


Abb. 1: Vermutete zelluläre und molekulare Mechanismen der Allergie. Sowohl lösliche Mediatoren als auch Zell-Zell-Kontakte führen zur Differenzierung naiver T-Zellen hin zum T_{H2} -Phänotyp. Diese Ausdifferenzierung kann durch vermehrte Bildung von T_{H1} -T-Zellen via IFN- γ unterdrückt werden. [aus Holgate, 1999]

Als Folge einer T_{H2} dominierten Immunantwort kommt es zu einer vermehrten Expression von IgE. Die Konzentration von IgE im Serum gesunder Individuen liegt im Bereich von 0,1 - 0,4 $\mu\text{g/ml}$. Selbst an schwerer Allergie leidende Patienten erreichen kaum 1,0 $\mu\text{g/ml}$ - im Vergleich dazu liegt die normale Konzentration von IgG im Serum bei ca. 10 mg/ml (Abbas et al., 1997). Die niedrige Konzentration war wahrscheinlich mit ein Grund, warum IgE erst 1967 als letzte AK-Klasse entdeckt wurde (Ishizaka et al., 1967).

Durch eine hochaffine Bindung ($K_m = 10^{-9}$) an den Fcε-Rezeptor I (FcεRI) werden selbst die geringen Mengen von IgE effizient aus dem Serum gebunden.

Dieser FcεRI befindet sich auf der Zelloberfläche von Mastzellen, basophilen Granulozyten und auf Langerhanszellen - eine Ag präsentierende Zelle in der Haut. Sind Basophile und Mastzellen nach Bindung von Ag-spezifischem IgE an FcεRI sensibilisiert, können diese nun nach erneutem Ag-Kontakt degranulieren. Die Degranulation geschieht durch Kreuzvernetzung von zwei oder mehr FcεRI, also in aller Regel durch ein Ag, das gebundenes Ag-spezifisches IgE kreuzvernetzt.

Die freigesetzten Inhaltsstoffe der Granula sind gut charakterisiert.

- Histamin, durch Decarboxylierung der Aminosäure Histidin entstanden, bindet nach Freisetzung an drei verschiedene Rezeptoren; H₁-Rezeptoren vermitteln die Kontraktion von intestinaler und bronchialer Muskulatur, erhöhen die Permeabilität in postkapillären Venolen und steigern die Schleimproduktion von Becherzellen. Durch Bindung an H₂-Rezeptoren steigt die Gefäßpermeabilität und die Aktivität exokriner Drüsen. Histamin hemmt seine eigene Freisetzung ebenfalls über H₂-Rezeptoren auf der Mastzelle. Über H₃-Rezeptoren wirkt Histamin dämpfend auf die Ausschüttung von Neurotransmittern im ZNS (Forth et al., 1996).
- Leukotriene und Prostaglandine werden im Gegensatz zu Histamin nicht in Mastzellen gespeichert, sondern aus den Phospholipiden der Plasmamembran nach Degranulierung synthetisiert, was zu einem verzögerten Auftreten von diesen Mediatoren führt. Sie erzeugen ebenso eine Bronchokonstriktion und eine vermehrte Gefäßpermeabilität, diese Effekte bleiben aber im Vergleich zu Histamin länger bestehen (Abbas et al., 1997).
- Zytokine: Menschliche Mastzellen setzen IL-4, IL-5, IL-6 und TNF-α frei. Diese Botenstoffe wirken chemotaktisch auf Entzündungszellen, wie z.B. neutrophile und eosinophile Granulozyten. IL-4 induziert in B-Zellen über Stat-6 den Ig-Klassenwechsel hin zu IgE (Hou et al., 1994; Quelle et al., 1995). IL-5 im Speziellen ist für die Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen zuständig. Die hohen Konzentrationen von TNF-α spielen eine Rolle beim anaphylaktischen Schock (Abbas et al., 1997).

Intention dieser Arbeit ist es, dem IgE als Trigger und Auslöser allergischer Reaktionen Rechnung zu tragen und eine Mauslinie zu etablieren, die spezifisches IgE überexprimieren kann. In diesem Zusammenhang muß der Begriff des „Gene-Targeting“ erläutert werden.

Thomas und Capecchi definierten 1987 den Begriff des „Gene-Targeting“ (Thomas und Capecchi, 1987). Gene-Targeting stellt die herausragende Technik für systematische, gezielte Veränderungen im Genom von Säugetieren dar. Das Prinzip des Gene-Targeting ist die homologe Rekombination, die ich anhand der folgenden Abbildung erklären möchte.

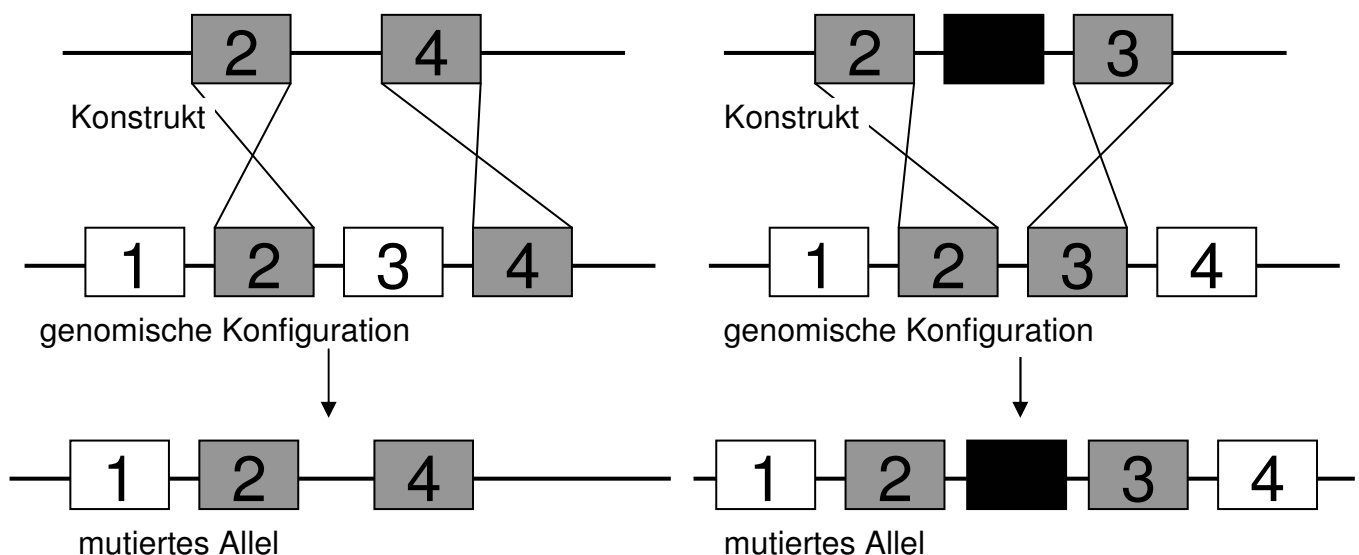


Abb. 2: Prinzip der homologen Rekombination. Eine genetische Veränderung (im linken Schema eine Deletion, im rechten Schema ein in das Genom zu inserierendes DNA-Fragment) flankiert von zur genomischen DNA homologen DNA-Abschnitte wird durch zelleigene Enzyme in das Genom integriert.

Somit war es möglich, durch gezieltes Einfügen von Mutationen in das Genom von embryonalen Stammzellen bestimmte Gene zu zerstören, was zu einer konstitutiven Inaktivierung des Genproduktes führt. Diese Technik nennt man „knock-out“. Durch Mutation in Stammzellen können diese genetischen Veränderungen auch an die Nachkommen weitergegeben werden, wodurch man die Möglichkeit erhält, an vielen gleichermaßen veränderten Lebewesen Untersuchungen über die Funktion des Genes

anzustellen. Aufgrund dieser Technik hatte man nun erstmals die Möglichkeit, abgesehen von zufällig aufgetretenen Mutationen, die Funktion bestimmter Gene im höheren Organismus zu untersuchen.

So werden seit längerer Zeit an Hefen, Würmern (*C. elegans*), Fliegen (*Drosophila melanogaster*) und Fischen (Zebrafisch) Untersuchungen angestellt. Als Modellorganismus für den Menschen hat sich aber wegen der biologischen Ähnlichkeit, wegen großer Übereinstimmung struktureller genomischer Einheiten und aufgrund der Möglichkeit, das Genom gezielt und effizient zu verändern, die Maus durchgesetzt (Denny et al., 2000).

Allerdings haben gendefiziente Mäuse auch ihre Limitationen.

Experimente mit knock-out-Mäusen stellen klar heraus, für welche Funktion das spezielle Gen *nicht* benötigt wird. Dies ist aber in aller Regel nicht Zielsetzung von Gene-Targeting Experimenten.

Aus der Analyse des genetisch veränderten Tieres können Theorien über die eigentliche Funktion des inaktivierten Genes angestellt werden. Dabei gilt es zu beachten, daß Genfunktionen des deletierten Genes häufig redundant sind, oder die Funktionen von anderen Genen übernommen werden können. Aufgrund dessen kann es des öfteren zu Fehldeutungen kommen. In Kenntnis dieser komplexen Interaktionen bereitet es oft Schwierigkeiten, phänotypische Veränderungen zu erkennen. Deswegen bedarf es adäquater Experimente, die die vermuteten Veränderungen nachzuweisen versuchen.

Im Folgenden sei nur ein kleiner Auszug aus Arbeiten der letzten Jahre erwähnt, die durch gezielte Mutationen im Erbgut der Maus wesentliche Erkenntnisse über die Funktion der einzelnen Bausteine des Immunsystems im Zusammenhang mit Allergie und IgE-Regulation erbracht haben.

So konnte Kühn et al. (1991) die Bedeutung von IL-4 *in vivo* durch Analyse von IL-4 defizienten Mäusen aufzeigen. Es fanden sich stark erniedrigte Serumwerte von IgG₁ und IgE. Ebenso zeigte sich eine Erniedrigung von IgG₁ bei der T-Zell abhängigen Immunantwort und ein Fehlen von IgE bei Wurminfektionen.

In immunisierten Mäusen, die durch einen knock-out den IFN- γ -Rezeptor nicht mehr exprimieren können, zeigten sich erhöhte Werte für IgG₁ und IgE und ein erniedrigter Serumspiegel für IgG_{2a}. Bis zu zwei Monaten nach einer einzigen Ag-Provokation

waren - im Gegensatz zu Wildtypmäusen - in diesen Mäusen Eosinophile nachzuweisen, außerdem produzierten gereinigte T-Zellen aus der Lunge der IFN- γ -Rezeptor defizienten Mäuse signifikant mehr IL-4 und IL-5 als T-Zellen von Wildtypmäusen (Coyle et al., 1996).

Dombrowicz et al. (1993) zeigte an Mäusen, denen der Fc ϵ RI fehlt, daß dieser für die Induktion der IgE-abhängigen Anaphylaxie notwendig ist, denn in diesen Mäusen konnte keine lokale oder systemische Anaphylaxie ausgelöst werden.

Im Gegensatz dazu beschrieb Oettgen et al. (1994), daß bei Mäusen, die kein IgE mehr produzieren - ein essentielles Gen der ϵ -Kette wurde deletiert - trotzdem Anaphylaxie ausgelöst werden kann. Das Verhalten der Vitalparameter und die Lungenfunktion der Maus waren identisch zu denen der WT-Maus. Oettgen folgerte daraus, daß es - zumindest in Mäusen - IgE unabhängige Hyperreaktivitäten im Sinne einer Anaphylaxie geben muß.

Zudem fand man bei Mäusen, die kein IgE mehr exprimieren können, eine drastische Reduktion von Fc ϵ RI auf Basophilen im Vergleich zu Wildtypmäusen. Man kam zu dem Schluß, daß IgE ein Regulator der Fc ϵ RI-Expression auf Basophilen ist, was bei IgE abhängigen allergischen Reaktionen zur Verstärkung der Effektorfunktion führt (Lantz et al., 1997).

Beim Menschen ist eine in der klinischen Diagnostik einer Allergie übliche Methode der RAST (Radio-Allergo-Sorbent-Test) oder EAST (Enzym-Allergo-Sorbent-Test). In diesen Tests werden spezifische IgE-AK gemessen. So findet man bei einem hohen Prozentsatz der Patienten mit Allergie erhöhte Spiegel von spezifischem IgE. Diese Verfahren werden im Vergleich zu den allgemein üblichen Hauttests (Pricktest) und anderen Provokationstests nicht durch Medikamente beeinflusst, sie liefern quantitative, vergleichbare Werte, belastigen den Patienten wenig und bergen keine Gefahr einer Anaphylaxie. Allerdings sind diese Verfahren teuer und die Ergebnisse nicht sofort verfügbar.

Eben Gesagtes impliziert eine direkte Proportionalität zwischen Höhe des spezifischen IgE-Spiegels und der Schwere der Krankheitszeichen.

Im Gegensatz dazu wurde an verschiedenen Tiermodellen, d.h. in der experimentellen Grundlagenforschung, in den letzten Jahren eine funktionelle Involvierung von IgE in der Pathogenese von Allergien in Zweifel gezogen (Oettgen et al., 1994; Hogan et al., 1997; Corry et al., 1998).

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, ein konstitutiv IgE überexprimierendes in-vivo-System zu entwickeln, um Regulation und Funktion von IgE genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde durch ein knock-in-Verfahren mittels homologer Rekombination die für die H-Kette des IgG₁-Isotypes codierende Sequenz durch die IgE-Sequenz ersetzt.

Auf folgende Fragen sollte die hier vorliegende Arbeit Antworten geben:

- Ist das unter der Regulation des IgG₁-Promoters stehende IgE funktionell?
- Ist eine spezifische IgE-Produktion alleine ausreichend um Symptome i. S. einer Allergie auszulösen?
- Ermöglicht dieses Tiermodell Einblicke in die Regulation der Allergieentstehung? Gibt es evtl. bisher unbekannte regulatorische Elemente, die die IgE-Expression steuern?
- Können erhöhte spezifische IgE-Titer zu Veränderungen im Organismus wie beispielsweise zu Änderungen im Zytokinprofil der T-Helferzellen führen? Wird eine erhöhte T_{H2}-Antwort gefördert?
- Welchen Einfluß hat vermehrt produziertes spezifisches IgE auf Mastzellen?

B MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden bei den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) erworben. Medien wurden mit Zusätzen der Firma Gibco/BRL (Eggenstein) hergestellt. Radioaktives ^{32}P -dATP (370 MBq/ml) wurde von der Firma Amersham Pharmacia Biotech Export (Uppsala, Schweden) bezogen.

1.2. Standard-Puffer, Lösungen und Medien

Hier werden Lösungen zusammengefaßt, die zum molekularbiologischen Arbeiten verwendet wurden. Zusätzlich werden Medien für die Zellkultur von eukaryontischen Zellen beschrieben.

Acrylamidstammlösung für Sequenziergel:

38 g Acrylamid
2g N,N Methylbisacrylamid
mit H_2O ad 100 ml, bei 4°C gelagert

DMEM-Medium:

DMEM mit 110 mg/l Na-Pyruvat, 4500 mg/l Glucose (Gico Life technologies)
10000 U/ml Penicillin u. 10000 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin
 1×10^{-4} M β_2 -Mercaptoethanol
15 % FCS für ES-Medium,
10 % FCS für EF-Medium, FCS (inaktiviert: 30 min. 56°C)
bei 4°C gelagert

Einfriermedium für eukaryontische Zellen:

10 % DMSO

30 % FCS

60 % vollständiges steriles DMEM,

bei 4°C gelagert.

LB-Medium:

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

pH 7,5

SOC-Medium:

20 g Trypton

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

10 ml 1 M MgCl_2

7,2 ml 50 % Glucose

mit dH_2O ad 1l; pH 7,5

Neutralisierungslösung für Southern-Blot:

1,5 M Tris

0,5 M NaCl

pH 7,5

Denhard's Lösung (50 X) für Southern-Blot :

5 g Ficoll (Typ 400, Pharmacia)

5 g Polyvinylpyrrolidon

5 g BSA

mit H_2O ad 500 ml, steril filtriert

SSPE-Puffer (20 X) für Southern-Blot:

3 M NaCl

0,2 M NaH₂PO₄

0,02 M EDTA

pH mit NaOH auf 7,4

SSC (20 X) für Southern-Blot:

175 g/l NaCl

88,2 g/l NaCitrat dest. Wasser

mit NaOH auf pH 7,4

TBE-Puffer (10 X):

60,5 g/l Tris-Base

30,5 g/l Borsäure

3,7 g/l EDTA

TE-Puffer:

10 ml 1 M Tris, pH 7,4

2 ml 0,5 M EDTA, pH 8

mit dH₂O ad 1 Liter

FACS-Puffer:

1 X PBS

3 % FCS (dialysiert!)

0,05 % Azid

Na-Acetatpuffer (100 X) für Immunperoxydase-Färbung:

28,7 g Na-Acetat

9,4 ml 100 %-ige Essigsäure

mit dH₂O ad 100 ml

Carbazollösung für Immunperoxydase-Färbung:

50 mg Carbazol

10 ml N, N - Dimethylformamid

2 ml 100 X Na-Acetatpuffer

mit dH₂O ad 200 ml

kurz vor Gebrauch 60 µl 30 % H₂O₂ dazugeben

Waschpuffer für ELISA (5 X):

2,5 g KH₂PO₄

10 g Na₂HPO₄ 2H₂O

40 g NaCl

2,5 ml Tween 20

mit H₂O ad 1l

Diethanolaminpuffer für ELISA:

97 ml Diethanolamin pH 9,8

0,02 % Natriumazid

0,8 g MgCl₂

mit H₂O ad 1l

Detektionslösung für ELISA:

TMB Lösung:

240 mg Tetramethylbenzidin in 5 ml Aceton lösen plus 45 ml Methanol

Citratpuffer:

42g Zitronensäure-Monohydrat in 950 ml H₂O lösen

pH 3,95 mit KOH-Plätzchen titrieren

mit H₂O ad 1l

+ 275 µl 30 % H₂O₂

TMB Lösung und Citratpuffer 1:20

1.3. DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen

Die Enzyme wurden im allgemeinen bei den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

1.4. Plasmide

Für Standardklonierungen wurde der Vektor pCR-Script der Firma Stratagene (Amsterdam) gewählt. Die mit loxP-Sites flankierte neo/tk-Kassette entstammt dem Vektor pneotk2loxP (Geschenk von Dr. Lars Nitschke, Universität Würzburg). Die genomischen Abschnitte der murinen γ_1 - u. ϵ -Kette (Shimizu et al., 1981; Ishida et al., 1982) bekamen wir von Tasuku Honjo, Department of Medical Chemistry Kyoto Univ. of Medicine Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606.

1.5. Bakterien

Plasmide wurden im Escherichia coli Stamm DH 5 α vermehrt. Der Stamm hat folgenden Phänotyp: F⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA - arg F)U169deoRrecA1endA1hsd R17(r_k⁻,m_k⁺) phoAsupE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96relA1.

Als cre exprimierenden Bakterienstamm verwendeten wir BNN132 (Geschenk von Prof. Michael Reth, MPI Freiburg).

1.6. PCR

Die PCR-Reaktionen wurden auf einem RoboCycler Gradient 96 (Stratagene) durchgeführt. Die Primer bestellten wir bei den Firmen Karl Roth (Karlsruhe) und Metabion (Martinsried). dNTPs, Puffer und Taq-Polymerase bezogen wir von Gibco Life Technologies.

Folgende PCR-Primer wurden verwendet:

| | |
|--------------|---|
| P 45 | 5'-TAC TTC CCT CAC TCT GTC CT-3' |
| P 46 | 5'-ATG GGA GTT CTG TCA TTC T-3' |
| P 74 | 5'-TCA ACC TAC AAA CGG AAA GAA-3' |
| P 75 | 5'-TCG TGA CAG AAG GTG GTA GTG-3' |
| P 76 | 5'-TTG AGG ACA GAA TGG TGA GAT-3' |
| P 77 | 5'-CTA AAC CCA AAC ACA GAC CTA-3' |
| P 80 | 5'-CCA GCG GAG AAC TAC AAG AA-3' |
| P 81 | 5'-CGA AGT TAT TAG GTC TGA AG-3' |
| P 167 | 5'-GCC CAG AAG GAT AAG AAA AC-3' |
| P KA BamH1 u | 5'-ACG GGA TCC CCT GGG GCA GTG TGA A-3' |
| P KA BamH1 l | 5'-CGG GAT CCC CTG TCA GAC AGG ACA GGA CAG G-3' |

1.7. Zelllinien

Als embryonale Stammzelllinien verwendeten wir Balb/c-1 (Noben-Trauth et al., 1996) und E14.1 (Kühn et al., 1991).

1.8. Mäusestämme

Für Verpaarungen wurden Balb/c Mäuse verwendet, zur cre-Deletion cre-Deleter-Mäuse des Mausstammes 129/Ola (Schwenk et al., 1995). Alle Tiere wurden unter SPF-Bedingungen gehalten.

1.9. Antikörper

Für ELISA wurden folgende Antikörper verwendet:

coat-AK:

| | |
|--|------------------------------|
| goat-anti-mouse-IgG ₁ (A85-3) | Pharmingen |
| goat-anti-mouse-IgM | Southern Biotechnologies |
| goat-anti-mouse-IgG _{2a} | Southern Biotechnologies |
| goat-anti-mouse-IgE (84-1C) | Geschenk von Prof. Z. Eshhar |

Nachweis-AK:

| | |
|---|------------------------------|
| HRP-anti-mouse-IgG ₁ (A85-1) | Pharmingen |
| AP-anti-mouse-IgM | Southern Biotechnologies |
| AP-anti-mouse-IgG _{2a} | Southern Biotechnologies |
| AP-anti-mouse-IgE (EM 95-3) | Geschenk von Prof. Z. Eshhar |

| | |
|---|------------------------------|
| Standards für IgG ₁ , IgM, IgG _{2a} | Southern Biotechnologies |
| Standard für IgE | Geschenk von Prof. G. Köhler |

Für FACS haben wir folgende Antikörper benutzt:

| | |
|--|----------------------------------|
| rat-anti-mouse-IFN γ -mAB-PE | Pharmingen |
| rat-anti-mouse-IL-4-mAB-PE | Pharmingen |
| mouse-IgG ₁ -Isotype-control-PE | Pharmingen |
| rat-anti-mouse-CD117(c-kit)-mAB-APC | Pharmingen |
| goat-anti-mouse-IgG ₁ -FITC | Southern Biotechnologies |
| rat-anti-mouse-CD23-PE | Southern Biotechnologies |
| Streptavidin-PE | Immunotech |
| rat-anti-mouse-CD45R/B220-mAB-FITC | Pharmingen |
| rat-anti-mouse-CD16/CD32-mAB (Fc-Block) | Pharmingen |
| rat-anti-mouse-IgM-FITC | Pharmingen |
| rat-anti-mouse-IgE-PE | Pharmingen |
| rat-anti-mouse-CD4-Bio | Geschenk v. Prof. Thomas Brocker |
| rat-anti-mouse-CD8-PE | Geschenk v. Prof. Thomas Brocker |

1.10. Computerprogramme

An Software benutzten wir „gene konstruktion kit 2™“ - ein Klonierungsprogramm der Firma Textco. Die ELISA-Auswertungen erfolgten mit SOFTmax[®] PRO 3.1. von Molecular Devices Corporation, Sunnyvale.

2. Methoden

2.1. Arbeiten mit DNA

2.1.1. Transformation von Bakterien

E. coli Bakterien wurden nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983) mit folgenden Puffern für die Aufnahme von Plasmid-DNA kompetent gemacht.

TFB 1: 30 mM KAc
 50 mM MnCl₂
 100 mM RbCl
 10 mM CaCl₂
 15 % (w/v) Glycerin
 pH 5,8 mit Essigsäure

TFB 2: 10 mM MOPS pH 7,0
 75 mM CaCl₂
 10 mM RbCl
 10 % (w/v) Glycerin

Die Lösungen wurden steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt. Mit einer einzelnen Bakterienkolonie wurde eine Kultur in LB-Medium (ohne AB) angelegt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1 bis 2 ml dieser Kultur wurden auf 100 ml LB-Medium mit 20 mM MgCl₂ verdünnt. Nach Erreichen der mittleren log-Phase (OD₅₅₀ = 0,5)

wurde die Kultur auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (600 g, 4°C, 5 min) und in 30 ml eisgekühltem TFB 1 aufgenommen. Nach einer Inkubation auf Eis für 2 bis 5 min wurden die Bakterien wie oben abzentrifugiert, das Pellet in 4 ml eisgekühltem TFB 2 aufgenommen, die Aliquots zu 0,2 ml in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Zur Transformation von Plasmid-DNA wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut, Plasmid-DNA zugegeben (0,1 bis 1 µg) und der Reaktionsansatz 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden 40 sec lang bei 42°C einem Hitzeimpuls ausgesetzt und anschließend wieder für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von SOC-Medium (ohne AB) bis zum Endvolumen 1 ml und einstündiger Inkubation im Bakterienschüttler wurde der Transformationsansatz auf mehrere Agarplatten mit einem Ampicillingehalt von 50 µg/ml ausplattiert.

2.1.2. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA („Maxipräp“)

Ampicillinresistente Einzelkolonien wurden gepickt und in 5 ml ampicillinhaltiges (50 µg/ml) LB-Medium gegeben. Nachdem die Vorkultur dicht bewachsen war, wurden damit 500 ml LB-Medium in einem 2 Liter-Kolben beimpft und über Nacht in einen Bakterienschüttler gestellt.

Die DNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des Maxipräp Kits der Firma Qiagen. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt.

2.1.3. Analytische Isolierung von Plasmid-DNA („Minipräp“)

Plasmid-DNA wurde in einem von Dr. P. Nielsen modifizierten Schnellverfahren isoliert (Birnboim et al., 1979). 3 ml ampicillinhaltiges Medium wurden mit einer Kolonie Bakterien beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die dicht gewachsenen Bakterien wurden 2 min bei 10.000 g abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl P1 (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris HCl) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse durch Zugabe von 300 µl P2 (200 mM NaOH / 10 %

SDS) und 10-minütiger Inkubation bei RT. Schließlich wurde die Lösung mit 300 µl P3 (300 mM Na-Acetat, 9 M LiCl) neutralisiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit - um übrige Zellbestandteile zu trennen - wurde der Überstand mit 750 µl Isopropanol gefällt und nochmals 15 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und dann in 50 µl dH₂O aufgelöst.

2.1.4. Agarosegel-Elektrophorese von DNA

Die Agarose wurde standardmäßig als 1 %-ige Suspension in TBE-Puffer angesetzt und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Sehr große DNA-Fragmente wurden in niedrigprozentigen Gelen aufgetrennt. Bei kleinen Fragmenten hingegen (<400 bp) erfolgte die Auftrennung mit höherprozentigen Gelen, z.B. 1,3 % bis 2 %.

Ethidiumbromid wurde in der Endkonzentration von 0,5 µg/ml zu der heißen Lösung gegeben und diese in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der eingesetzte Gelkamm entfernt und die Kammer mit 1 X TBE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden mit Ladepuffer (1 X TBE, 20 % Glycerin, 10 % Bromphenolblau-Lösung) versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte in Flachbett-Elektrophorese-Apparaturen bei Spannungen zwischen 20 und 140 Volt. Die Bandenmuster wurden mit einer Videokamera aufgenommen und ausgedruckt.

2.1.5. Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Nach Auftrennung durch Elektrophorese wurde aus einem präparativen Agarosegel das Stück mit der gewünschten Bande ausgeschnitten und mit dem DNA-Präparationskit von Pharmacia aufgearbeitet.

2.1.6. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase ligiert. Generell wurde in Ligationsreaktionen ein molares Verhältnis von 4:1 von Insert zu Vektor-DNA gewählt. Zu den DNA-Fragmenten wurde 1 µl 10 X Ligase-Puffer von New England Biolabs, 1 µl T4-DNA-Ligase und Wasser auf 10 µl gegeben. Es schloß sich die Inkubation des Reaktionsansatzes bei 16°C über Nacht an.

2.1.7. Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase (CIPen)

Um eine Rezirkularisierung des Vektors bei der Ligation zu verhindern, wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt. Das Enzym wurde in der Menge von 0,01 U CIP für 1 pmol freie Enden des Vektors eingesetzt. Zum Ansatz wurden 5 µl 10 X CIP-Puffer und Wasser auf 50 µl gegeben. Bei überhängenden Enden erfolgte eine Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37°C für 15 min. Stumpfe Enden erforderten einen längeren Dephosphorylierungsschritt (20 min 37°C und dann erneute Zugabe von 1 µl CIP bei weiteren 15 min Inkubation bei 56°C). Das Enzym wurde durch Zugabe von EDTA und Inkubation für 10 min bei 75°C inaktiviert. Schließlich erfolgte eine Aufreinigung des dephosphorylierten Fragments durch Phenol-Extraktion mit anschließender EtOH-Präzipitation.

2.1.8. Auffüllen von überhängenden 5'-Enden von DNA-Fragmenten mit dem Klenow-Fragment

5'-Überhängende-Enden von Restriktionsschnittstellen wurden durch Auffüllen der Enden zu stumpfen Enden umgewandelt („blunt gemacht“). Damit konnten bei anschließender Religation Schnittstellen zerstört werden oder Fragmente mit nicht passenden Schnittstellen in stumpfe Vektoren kloniert werden.

Ansatz: x μ l DNA-Fragment (bis zu 10 μ g)
 3 μ l 10 X Klenow-Polymerase-Puffer
 3 μ l dNTP-Mischung (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; je 0,5 mM)
 1 μ l Klenow-Fragment (2 - 10 U/ μ l)
 dH₂O auf 30 μ l

Der Ansatz wurde für 20 min bei RT inkubiert, das Enzym durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert und die DNA mit EtOH gefällt.

2.1.9. Auffüllen von überhängenden 3'-Enden mit der T4-Polymerase

Ansatz: x μ l DNA-Fragment (bis zu 10 μ g)
 4 μ l 5 X T4-Polymerase-Puffer
 1 μ l 2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; je 0,5 mM)
 1 μ l T4-Polymerase (2 - 10 U/ μ l)
 dH₂O ad 20 μ l

Der Ansatz wurde 20 min lang bei 16°C inkubiert, das Enzym durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert und die DNA mit EtOH gefällt.

2.1.10. Sequenzieren

DNA wurde entweder bei der Firma GATC GmbH (Konstanz) oder selbst auf dem institutseigenen ALF-Reader (Pharmacia) sequenziert.

Hierfür wurden 5 - 10 μ g DNA in 32 μ l gelöst. Nach dem Hinzugeben von 8 μ l 2 M NaOH folgte eine 10-minütige Inkubation bei RT. Es wurden 7 μ l 3 M NaAcetat (pH 4,8) und 4 μ l H₂O hinzugegeben. Die Präzipitation erfolgte mit 120 μ l 100 % EtOH. Das getrocknete Pellet wurde in 12 μ l dH₂O gelöst, 2 μ l Primer (4 - 400 pmol) und 2 μ l Annealing-Buffer (alle hier im folgenden erwähnten Chemikalien: ALFexpress

AutoRead Sequenzierung Kit) wurden hinzupipettiert. Es schlossen sich eine Reihe von Inkubationsschritten an: 5 min bei 65°C, sofort 10 min auf 37°C Wasserbad und schließlich mindestens 5 min RT.

Während dieser Zeit mußte man die T7-Polymerase 1:1 mit Enzyme Diluting Buffer verdünnen, die MicroSample-Platte beschriften und jeweils 3 µl des A, G, C, T-Mixes vorlegen. Zu den Tubes gab man nun 1 µl des ALFexpress dATP-Labeling-Mixes. Zeitversetzt startete man jede Sequenzierreaktion durch Zugabe von 2 µl verdünnter T7-Polymerase, um für jede Reaktion eine genau 5-minütige Inkubation bei RT zu gewährleisten. Hierauf erfolgte die Zugabe von 1 µl Extension-Buffer und 3,5 µl DMSO. Die folgenden Schritte mußten bei 37°C durchgeführt werden. Nun pipettierte man 5,4 µl in jedes well (mit dem jeweils vorgelegten A-, G-, C- oder T-Mix). Auch hieran schloß sich eine genau 5-minütige Inkubation bei 37°C. Mit der Zugabe von 6 µl Stop-Solution wurde die Sequenzierreaktion beendet.

Vor dem Auftragen auf das vorbereitete Acrylamidgel wurde die MicroSample-Platte 3 min lang bei 85°C behandelt.

2.1.11. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Menge der gelösten DNA wurde durch UV-Licht-Absorption bei 260 nm mit einem Spektrophotometer (Hitachi) bestimmt. Dabei entspricht eine OD von 1 etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Für einzelsträngige DNA gilt der Umrechnungsfaktor $1 \text{ OD} = 33 \text{ µg DNA/ml}$.

2.1.12. Isolierung von DNA aus Mäuseschwanzspitzen

Für die routinemäßige Untersuchung von genomischer DNA aus Mäuseschwanzspitzen wurde ein vereinfachtes Protokoll verwendet, das die schnelle Aufarbeitung vieler Proben ermöglicht (Laird et al., 1991). Ca. 1 cm lange Schwanzspitzen von mindestens 3 Wochen alten Mäusen wurden nach Zerkleinerung

mit Schere oder Skalpell in ca. 1 mm große Stücke in ein Eppendorf-Tube mit 0,5 ml Lyse-Puffer (100 mM Tris/HCl (pH 8,5); 5 mM EDTA; 0,2 % SDS; 200 mM NaCl, 100 µg/ml Proteinase K) gegeben. Dabei ist die sorgfältige Säuberung der Schere zwischen den einzelnen Mäusen besonders wichtig, da hier ein hohes Kontaminationspotential für nachfolgende PCR-Tests besteht. Die Proben wurden bei 56°C über Nacht inkubiert, die Haare und Gewebereste abzentrifugiert (16.000 g, 10 min), der Überstand mehrere Male phenolisiert, die DNA mit EtOH präzipitiert und schließlich das Pellet in dH₂O aufgelöst.

2.1.13. Präparation genomischer eukaryontischer DNA

Im Gegensatz zu den kleinen Plasmiden von Bakterien ist die genomische DNA von Eukaryonten sehr empfindlich gegenüber Scherkräften bei der Präparation. Die DNA wird weder auf dem Mixer geschüttelt noch durch dünne Spitzen pipettiert.

5×10^7 Zellen wurden vereinzelt, mehrmals mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Proteinase-K-Lsg. (1 mg/ml in 10 mM Tris (pH 7,0); 10 mM EDTA; 100 mM NaCl) resuspendiert, SDS (0,4 % Endkonzentration) zugegeben und der Reaktionsansatz bei 56°C über Nacht inkubiert. Die klare Lösung wurde solange mit Phenol ausgeschüttelt, bis keine Interphase mehr zu sehen war. Dann wurde 1/10 Vol. 3,0 M NaAc und 3 Vol. EtOH zugegeben. Die präzipitierte DNA konnte mit einer ausgezogenen Pasteurpipette „gefischt“, mit 70 % EtOH gewaschen und in dH₂O gelöst werden.

2.1.14. Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 0,5 - 1 µg DNA mit 10 Units Enzym bei 37°C verdaut. Nach einer Stunde konnte die DNA auf einem Gel getrennt werden. Bei Spaltung von genomischer DNA für Southern-Blots wurde die Inkubationszeit auf bis zu 15 h erhöht und Enzym im Überschuß zugegeben.

2.1.15. Transfer von DNA-Fragmenten auf Membranen durch Kapillarwirkung

Das Protokoll zum Transfer von DNA auf Membranen beruht auf einer von Southern (Southern, 1975) beschriebenen Methode. Plasmid- oder genomische DNA wurde mit Restriktionsenzymen verdaut und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese photographiert. DNA wurde im Gel durch Inkubation in 0,25 M HCl (15 min) depuriniert (Wahl et al., 1979) und durch Inkubation in 0,4 M NaOH + 1,5 M NaCl (30 min) denaturiert. Durch Inkubation in Neutralisierungslösung (30 min) wurde das Gel neutralisiert.

Die Apparatur zum DNA-Transfer wurde folgendermaßen aufgebaut: Auf eine Glasplatte wurde ein Whatman 3 MM Papier so gelegt, daß beide Enden in ein Pufferreservoir mit 20 X SSC reichten. Darauf wurde das Gel und auf das Gel ein auf Gelgröße zugeschnittenes Stück Nylonmembran („Biodyne B“, Pall, Dreieich, positiv geladen) sowie drei 3 MM Papiere, befeuchtet mit 20 X SSC, geschichtet. Darüber kam ein Stapel Einmalhandtücher (Apura) und als Gewicht eine Glasplatte. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt. Die DNA wurde auf der Membran durch Bestrahlung mit UV in dem Stratalinker 2400 (Stratagene) fixiert. Um Agarosereste zu entfernen, wurde die Membran abschließend mit 2 X SSC abgespült.

2.1.16. Hybridisierung membrangebundener DNA-Fragmente mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die Nylonmembran wurde in einen dicht schließenden Glaszylinder gegeben. Dazu wurden 20 ml Hybridisierungspuffer folgender Zusammensetzung hinzugefügt:

5 X Denhards-Lösung

5 X SSPE-Puffer

0,2 % SDS

0,2 mg/ml Lachssperma-DNA (GibcoBRL), vor Zugabe mit Ultraschall geschert und für 10 min auf 100°C erhitzt.

Das Glasgefäß mit Membran und Hybridisierungslösung wurde fest verschlossen und für mindestens 3 h unter ständigem Schütteln bei 65°C inkubiert. Die Probe wurde zwischenzeitlich mit dem Random-Primer-DNA-Labeling-Set von GibcoBRL radioaktiv markiert. Nach der Prähybridisierung wurde die 5 min bei 96°C denaturierte, radioaktiv markierte Sonde (ca. 2×10^6 cpm/ml) zugegeben und weitere 12 h bei 65°C geschüttelt. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal bei 65°C für je 30 min mit 0,5 X SSC und 0,2 % SDS gewaschen. Dann wurde mit einem Zählgerät gemessen, ob die meiste Radioaktivität abgewaschen war. War dies nicht der Fall, wurde noch einmal unter den gleichen Bedingungen gewaschen. Falls nötig, wurde dann zweimal mit 0,1 % SSC und 0,1 % SDS für je 15 min bei 65°C gewaschen. Dann wurde wieder mit einem Zählgerät gemessen. Gegebenenfalls wurde als letzter Waschschrift Proteinase K (Boehringer Mannheim) in 50 µg/ml zugegeben und bei 56°C für 15 min geschüttelt. Die Membran wurde in Plastikfolie eingewickelt und in einer Filmkassette Kodak X-omat S oder Kodak X-omat AR-Filme bei -80°C autoradiographisch bis zu 3 Tage exponiert.

2.1.17. Identifizierung von Inserts in Bakterienkolonien durch in-situ-Lyse und Transfer von DNA auf Membran (colony-screen)

Um nach einer Transformation positive Bakterienkolonien zu finden, wurde das Verfahren der in-situ-Lyse auf Nylonmembranen verwendet. Dabei wurde ein Schnellverfahren angewendet, das mit Hilfe einer Mikrowelle die Bakterien lysiert. Die kleinen Bakterienkolonien wurden durch das Auflegen eines Nylonfilters „abgeklatscht“. Die Orientierung mußte genau markiert werden. Die Platten wurden zur Inkubation wieder in den Brutschrank gestellt. Währenddessen wurden die Filter auf ein mit 2 X SSC und 5 % SDS getränktes Papier gelegt und in der Mikrowelle 3 min bei voller Leistung lysiert. Die Filter konnten dann direkt zur Hybridisierung mit radioaktiven DNA-Proben verwendet werden. Nach Auswertung des entwickelten Filmes konnten mit den in der Zwischenzeit wieder hochgewachsenen Kolonien, die das gesuchte Insert tragen, Bakterienkulturen angelegt werden.

2.2. Arbeiten mit RNA

2.2.1. Isolation von RNA aus Gewebe und Zellkultur-Zellen

Das Hauptproblem der Isolierung von RNA oder mRNA ist der Schutz der Präparation vor RNAsen. Da diese Enzyme allgegenwärtig und sehr stabil sind, ist es notwendig, einige Vorkehrungen zu treffen. Es muß mit Handschuhen gearbeitet werden und - soweit möglich - mit Einweggeräten. Glasgeräte und Lösungen werden mit 0,1 % DEPC über Nacht behandelt und dann autoklaviert.

Die Extraktion von RNA aus Gewebe erfolgte aus in flüssigem Stickstoff schockgefrorenem Material. Unter stetiger Zugabe von flüssigem Stickstoff wurden die Gewebe mit Mörser und Pistill fein zerrieben. Eine Milz oder bis zu 5×10^7 Zellkultur-Zellen wurden in 5 ml TRIZOL[®] (GibcoBRL) lysiert. Die Lösung wurde zudem mehrmals durch eine 18-gauge Kanüle gedrückt.

Nach 5-minütiger Inkubation bei RT folgt die Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml TRIZOL[®]-Reagenz. Nun wurde kräftig geschüttelt und nach einer 2-minütigen Inkubation bei RT die Phasen durch Zentrifugation (15 min, 12.000 g) getrennt.

Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol pro ml TRIZOL[®]-Reagenz gefällt, das entstandene Präzipitat mit 75 %-igem EtOH gewaschen, aufgelöst und erneut bei 7.500 g und 6°C 5 min lang präzipitiert. Das zweite Präzipitat wurde kurz getrocknet, in DEPC-Wasser aufgenommen und für 10 min bei 60°C inkubiert. Danach erfolgte die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung.

2.2.2. Kontrolle der Integrität der RNA mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

Nicht denaturierte RNA erkennt man im Agarosegel an zwei distinkten Banden, nämlich der 40 S und 60 S RNA der Ribosomen.

2.2.3. Reverse Transkription von RNA in cDNA

Die isolierte RNA muß zur komplementären DNA (cDNA) revers transkribiert werden, da in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nur DNA-Stücke durch das Enzym „Taq-Polymerase“ amplifiziert werden können.

Die reverse Transkription (RT) erfolgte mit dem Enzym Moloney-murine Leukemievirus-reverse-Transkriptase (MMLV-RT). Wir benutzten die Superscript II[®]-Polymerase von GibcoBRL. Als Startstellen für das Enzym dienen zufällige angelagerte Hexamer-Oligonukleotide, so daß die gesamte zelluläre RNA umgeschrieben werden kann. Um RNase-Aktivitäten zu minimieren, muß auf Eis pipettiert werden. Zu 1 - 5 µg RNA wurden 2 µl Hexamere (0,6 ng/µl) und DEPC dH₂O ad 11 µl pipettiert. Dieser Ansatz wurde nach 10-minütigem Erhitzen bei 70°C sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 µl 5 X Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs und 1 µl RNase-Inhibitoren hinzugegeben und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Dieser Schritt führte zur Anlagerung der Hexamere. Nach 2-minütiger Inkubation bei 42°C erfolgte die Zugabe von 1 µl Superscript II[®]-Polymerase (200 units). Die Transkription fand dann für 50 min bei 42°C statt. Anschließend wurde die Reaktion durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C beendet.

2.2.4. Quantitative PCR (QPCR)

Für die Quantifizierung der Cytokin-mRNA wurde das Standardplasmid pMUS (Bouaboula et al., 1992) in einer seriellen Verdünnungsreihe eingesetzt. Unter Berücksichtigung der Plasmidgröße (für pMUS 3450 bp) und des Molekulargewichts eines Basenpaares (649 Da) ergibt sich, daß 3,73 ng Plasmid/ml einer Kopienzahl von 1×10^6 Molekülen/µl entsprechen. Von dieser Ausgangskonzentration wurde je eine vierfache, serielle Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnungsstufe von 15 Molekülen/µl, erstellt.

Aus Milzzellen wurde RNA präpariert und diese mittels Reverser-Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA haben wir anschließend mit β_2 -Mikroglobulin

standardisiert, um immer eine vergleichbare Menge an cDNA in die PCR-Reaktion einzusetzen. β_2 -Mikroglobulin ist ein in jeder Zelle annähernd gleich exprimiertes Protein. Durch Ermittlung des Äquivalenzpunktes, d.h. beide Banden - die der cDNA und die des kompetitiven Plasmides - haben die gleiche Intensität, kann das Verhältnis der eingesetzten cDNAs abgeschätzt werden. Liegt bei einer cDNA-A der Äquivalenzpunkt bei der Plasmidverdünnung Nr. 2 und der Äquivalenzpunkt einer anderen cDNA-B bei Plasmidverdünnung Nr. 1, so bedeutet dies, daß viermal mehr cDNA-B pro Volumen vorliegt als cDNA-A. Dieses Verhältnis wird bei der anschließenden eigentlichen QPCR berücksichtigt.

Nach Isolierung der Milzzellen und Separation von $CD4^+$ Zellen mittels magnetischer Markierung (MACS[®], Miltenyi Biotec) haben wir von den $CD4^+$ und $CD4^-$ Zellen RNA präpariert.

Nach folgenden Zytokinen haben wir sowohl unimmunisierte als auch mehrmals mit DNP-KLH immunisierte WT- und IgE-knock-in-Mäuse untersucht:

| Zytokin | kompetitives Plasmid | Primer |
|--------------------------|----------------------|--|
| IFN- γ | pMUS | 5'-GCTCTGAGACAATGAACGCT-3' 5'-AAAGAGATAATCTGGCTCTGC-3' |
| IL-4 | pMUS | 5'-TCGGCATT TTTGAACGAGGTC-3' 5'-GAAAAGCCCGAAAGAGTCTC-3' |
| β_2 -Mikroglobulin | pMUS | 5'-TGACCGGCTTGTATGCTATC-3' 5'-CAGTGTGAGCCAGGATATAG-3' |

Als PCR-Bedingungen wählten wir für alle genannten Primer folgende Einstellungen:

1. 94°C 3 min - 1mal
2. 94°C 45 s
56°C 45 s - 33mal
72°C 45 s
3. 72°C 5 min - 1mal

Quantifizierung von Cytokin-mRNA durch kompetitive PCR

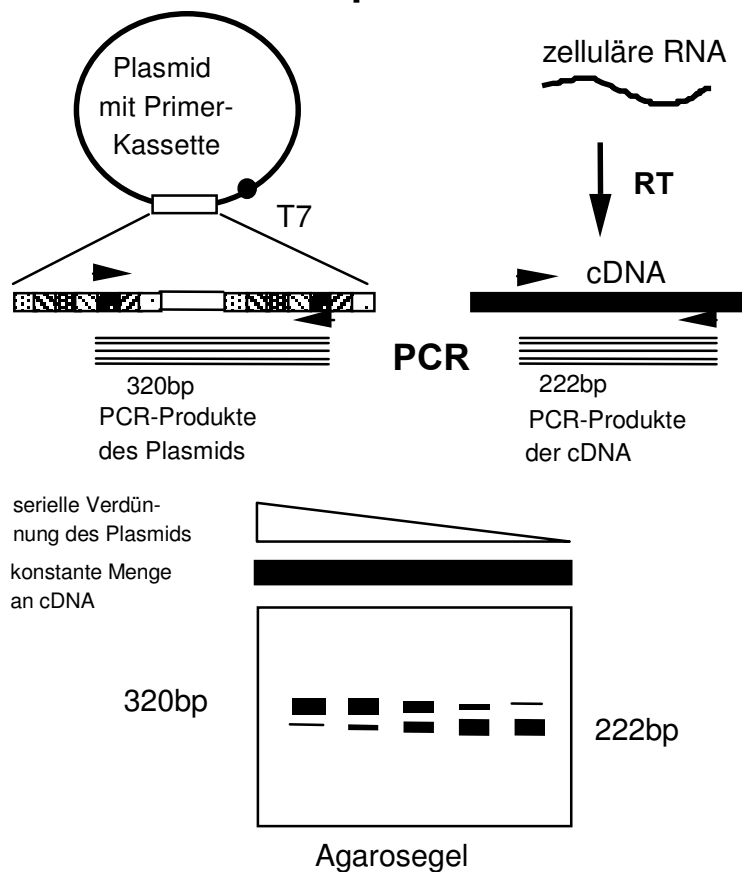


Abb. 3: Prinzip der Quantitativen PCR [nach Kopf, M.]

2.3. Zellkultur

Die hier beschriebenen Techniken haben Dr. Lars Nitschke und Dr. Manfred Kopf am MPI Freiburg entwickelt. Sie sind bei uns im Labor übernommen worden.

Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C, 8 % CO₂ kultiviert.

2.3.1. Gewinnung Embryonaler Fibroblasten

Embryonen von neomycin-Resistenzgen-transgenen-Mäusen wurden am Tag 13 nach Begattung isoliert. Eine bis vier trächtige Mäuse haben wir für eine Präparation verwendet. Nach sterilem Freipräparieren der Embryonen aus der Fruchtblase wurden Kopf und fötale Leber mit Pinzette und Skalpell entfernt, die Embryonen durch Eintauchen in PBS zweimal gewaschen und durch eine 18-gauge Kanüle gepreßt. Bis zu 15 ml Trypsin/EDTA (GibcoBRL) wurden je nach Zahl der Embryonen zum Gewebe gegeben und der Reaktionsansatz bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 15 ml PBS und Resuspension konnte nach kurzer Sedimentation der Überstand mit den losgelösten EF abgenommen werden. Mit komplettem DMEM wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen anschließend abzentrifugiert (300 g, 5 min). Die Zellen konnten in komplettem DMEM-Medium aufgenommen und auf 80 cm² Gewebekulturflaschen ausplattiert werden. Zu den Geweberesten wurde wieder 15 ml Trypsin gegeben und der ganze Zyklus bis zu sechsmal wiederholt. Die EF wurden unter 1 - 2-maligem Mediumwechsel kultiviert, bis die Flaschen konfluent bewachsen waren. Die Ausbeute pro Embryo betrug ungefähr eine 80 cm² Flasche an EF, die in 2 Aliquots eingefroren und in flüssigem N₂ gelagert wurden. Es wurden bis zu 4 Passagen benötigt, um aus einem Aliquot 12 konfluente 175 cm² Gewebekulturflaschen zu bekommen. Um unerwünschte Proliferation der Fibroblasten in der ES-Zellkultur zu vermeiden, erfolgte eine 12-minütige Bestrahlung mit γ -Strahlen (1.200 rad).

2.3.2. Kultur Embryonaler Fibroblasten

Um eine Differenzierung der pluripotenten ES-Zellen zu verhindern, müssen die ES-Zellen auf einem Rasen aus „feeder-cells“ gezüchtet werden. Die embryonalen Fibroblasten produzieren den Faktor LIF, der in vitro die Differenzierung von ES-Zellen verhindert (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988).

2.3.3. ES-Zell-Kultur

Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse von 3,5 Tage alten Blastozysten gewonnen. Sie ähneln Teratocarcinoma-Zellen, haben jedoch die Fähigkeit der Pluripotenz nicht verloren. Sie können, in vivo zurückgebracht, alle Gewebe inklusive der Keimbahn bilden. Um die Differenzierung zu verhindern, wurden sie auf EF kultiviert und mit zusätzlichem LIF (Williams et al., 1988; Smith et al., 1988) versorgt. LIF wurde aus dem Überstand einer mit dem LIF-Gen transfektierten Zelllinie gewonnen (Genetics Institute, Boston). ES-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 15 % FCS kultiviert. ES-Zellen mußten alle 2 bis 3 Tage passagiert werden. Das Medium wurde abgesaugt, die Gewebekulturschalen mit PBS zweimal gewaschen und dann ca. 8 min mit 5 ml Trypsin inkubiert. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurden die ES-Klone aufgebrochen und vereinzelt. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurden 5 ml Medium zugegeben, die Zellen abzentrifugiert, resuspendiert und auf frische EF-Platten ausplattiert.

2.3.4. Gentransfer in ES-Zellen

Da die homologe Rekombination ein seltenes Ereignis ist, muß man eine maximale Anzahl von ES-Zellen mit dem Target-Vektor transfektieren. Dazu verwendet man die Elektroporation.

Vier 175 cm²-Flaschen konfluenter ES-Zellen (ca. 5×10^7 Zellen) wurden trypsiniert, 1×10^7 Zellen in 0,7 ml DMEM aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette

(Biorad) gefüllt. Dazu wurden 100 µg linearisierter Vektor in 100 µl PBS gelöst. Nach 10 min wurde mit einem Biorad-Genepulser ein Impuls ausgelöst, die eingestellten Parameter waren 470 µF und 170 V. Danach wurde der Ansatz nochmals 5 min auf Eis inkubiert.

Dann wurden die Zellen auf 8 - 12 Petrischalen verteilt. Die Dichte war $4 - 6 \times 10^6$ Zellen pro 64 cm² Kulturschale.

2.3.5. Selektion von elektroporierten ES-Zellen

Nach einem Protokoll von Mansour et al. (1988) wurden die Zellen einer positiven Selektion unterworfen. Die positive Selektion wird nach dem Vorhandensein der Neomycin-Resistenz-Kassette (neor) im Zentrum des Vektors durchgeführt. Am Tag 1 nach der Elektroporation wurde dem Medium G418 (\cong Neomycin) (0,4 mg/ml) zugesetzt. Die Selektion wurde unter wiederholtem Wechsel des Mediums 7 bis 12 Tage (je nach Zelllinie) fortgesetzt. Zum Schluß waren die resistenten Klone bis zu einer mit bloßem Auge sichtbaren Größe herangewachsen.

2.3.6. Isolation von einzelnen ES-Zellklonen

Nach spätestens 12 Tagen Selektion wurden die Klone „gepickt“ (Nitschke et al., 1993), wobei die eine Hälfte für die PCR verwendet wurde und die andere zur Expansion des Klonen. Die Platten mit den Klonen wurden mit PBS gewaschen und mit 10 ml PBS bedeckt stehen gelassen. Mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette wurden einzelne Klone in ca. 25 µl PBS vom Boden der Platten abgelöst und in eine U96 Microtiterplatte gegeben. Dabei wurden die einzelnen Klone so verteilt, daß die nächsten Schritte mit einer 12er-Multipipette durchgeführt werden konnten. Es wurden jeweils 25 µl Trypsin zugegeben, der Ansatz 8 min bei 37°C inkubiert und die Klone danach mit einer Multipipette durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die eine Hälfte der Zellsuspension wurde auf vorbereitete 48er-Zellkulturplatten mit EF verteilt und

weiter kultiviert. Die zweite Hälfte wurde 1mal mit PBS gewaschen und in der Platte abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden durch 50 µl Wasser und Inkubation bei 80°C für 15 min lysiert. Zum Lysat wurde 25 µl einer Proteinase K-Lösung gegeben (Endkonzentration 0,4 µg/ml) und über Nacht bei 56°C inkubiert. Während der Inkubation waren die Platten in Folie gewickelt, um zu großen Flüssigkeitsverlust zu verhindern. Vor der PCR erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K durch 10-minütiges Erhitzen auf 98°C in der PCR-Maschine mit beheiztem Deckel, um einen Flüssigkeitsniederschlag im Tube zu verhindern.

2.3.7. Nachweis der Homologen Rekombination in transfezierten ES-Zellen mittels PCR

Die angewandte Methode beruht auf der von Dr. Lars Nitschke entwickelten PCR-Methode (Nitschke et al., 1993). Die Sensitivität und Spezifität beruht auf der Anwendung der „nested-primer“-PCR-Technik. Das heißt, daß 2 PCR-Reaktionen ineinander verschachtelt werden. Somit kann eine hohe Gesamtzyklenzahl erreicht werden. Dies ist der Grund für die extreme Empfindlichkeit des Nachweises. Durch die „Voramplifikation“ mit einem Paar Primer und der zweiten PCR mit den inneren Primern wird die Spezifität stark erhöht, da durch falsches Primen entstandene Amplifikate, die aus der ersten, der äußeren PCR stammen, mit nur geringer Wahrscheinlichkeit auch das zweite Paar von Primern binden können.

Je 6 µl des Lysates (2.3.) von 5 Klonen wurden zusammen analysiert. Zu den 30 µl DNA-Lysat wurden hinzupipettiert:

5 µl 10 X Taq-Puffer

2 µl je Primer (60 ng/ml)

1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)

11,5 µl dH₂O

0,5 µl Taq-Polymerase (Gibco)

Es wurden zwischen 20 und 48 PCR-Reaktionen gleichzeitig angesetzt.

Bei Identifizierung eines positiven 5er-Pools wurde mit 10 µl des Lysats eines einzelnen Klonen des Pools erneut eine nested-PCR durchgeführt, um den positiven Klon zu ermitteln.

2.3.8. Blastozysten-Injektion und Reimplantation von Blastozysten

Die Blastozysten-Injektion wurde von Prof. Klaus Pfeffer und seinen Mitarbeitern an der GSF Neuherberg durchgeführt.

3,5 Tage alte Blastozysten wurden aus dem Uterus entnommen und mit M2-Medium gewaschen. Sie wurden in M16-Medium im 37°C-Inkubator aufbewahrt und konnten sich in-vitro noch weiter entwickeln. So konnten sich auch Morulas noch zu Blastozysten entwickeln.

Die ES-Zellklone wurden trypsinisiert und auf kleine Petrischalen plattiert. Nach einer Stunde konnten die ES-Zellen durch vorsichtiges Abwaschen von den EF getrennt werden. Dieses Vorgehen ist sehr wichtig, da die Fibroblasten durch ihre Klebrigkeit die Injektion stark stören können. Mit Hilfe von selbst gezogenen Injektionsnadeln und einem Mikromanipulator (Research Instruments) wurden 10 - 20 ES-Zellen in einen Blastozysten injiziert. Die Blastozysten wurden dann in den Uterus einer scheinschwangeren CD-1 Amme eingesetzt (scheinschwangere Mäuse entstehen durch Verpaarung mit einem vasktomierten Männchen). Für die Blastozysten-Reimplantation wurden die Ammenmütter mit Ketamin u. Rompun betäubt (500 µl Ketamin 10% + 250 µl Rompun 2 % mit 0,9 % NaCl auf 5 ml; dann pro Maus 250 µl). Fell und Muskelschicht wurden durchtrennt und der Uterus freigelegt. Bis zu zehn Blastozysten wurden pro Uterus reimplantiert. Nach dem Vernähen der Operationswunde wurde die Maus in Papiertücher gewickelt und mit Rotlicht gewärmt. Einige Tage später konnte man sehen, ob die Mäuse trächtig geworden waren. Ca. 7 Tage nach der Geburt konnte der Chimärismus anhand der Fellfarbe bestimmt werden.

2.4. Fixierung und Peroxidasefärbung von Zellen auf Objektträger

Circa 1×10^5 Zellen wurden mit Hilfe eines Cytospins (Cytospin 2, Fa. Shandon) auf einem Objektträger fixiert. Nach dem Trocknen der Objektträger wurden diese 5 min in Aceton fixiert. Nach dem Verdampfen des restlichen Acetons wurde der verdünnte (5 µl Antikörper; 200 µl FCS; 795 µl PBS) Antikörper (bereits mit Peroxydase gelabelt) aufgetragen. Es folgte eine 1-stündige Inkubation in einer feuchten Kammer bei RT. Nach dem vorsichtigen Entfernen des Antikörpers wurden die Objektträger dreimal in PBS gewaschen und anschließend in frisch zubereiteter Carbazol-Lösung 12 min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden die Präparate getrocknet und mit Gelatine und Deckgläschen überschichtet.

2.5. Isolierung von Milzzellen der Maus

Die Maus wurde mit CO₂ getötet, in einem Zellkulturflow fixiert und mit 70 % EtOH gewaschen. Dann wurde die Bauchdecke mit einer sterilen Schere eröffnet und die Milz mit einer Pinzette entnommen. Das Organ wurde in eiskaltem Medium aufbewahrt, zwischen zwei Objektträgern zerquetscht und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren mit Medium vereinzelt.

2.6. Gewinnung von Serum aus dem Blut von Mäusen

Aus der Schwanzvene von vorher erwärmten Mäusen wurde durch leichtes Anritzen Blut gewonnen. Für FACS-Analysen wurde 1/10 Vol. Heparin (Hoffman - La Roche, Basel) zugegeben. Zur Serumgewinnung wurde das Blut über Nacht bei 4°C gelagert und am nächsten Tag abzentrifugiert (720 g, 8 min). Die endgültige Lagerung des Serums erfolgte bei -20°C.

2.7. Erythrozytenlyse

Um für FACS-Experimente reine Lymphozyten ohne Erythrozytenkontamination zu bekommen, wurden Milz und Knochenmark mit Gey's-Lösung behandelt. Die vereinzelter Zellen wurden mit 4 ml Gey's versetzt und 5 min auf Eis stehen gelassen. Die Zellen wurden durch ein FCS-Kissen bei 300 g, 5 min abzentrifugiert und dann zweimal mit PBS gewaschen.

Gey's wurde folgendermaßen hergestellt:

Lösung A: 35 g NH_4Cl

1,85 g KCl

1,5 g Na_2HPO_4

0,2 g KH_2PO_4

5,0 g Glukose

50 mg Phenolrot

Diese Substanzen wurden in 1 l dH_2O gelöst und autoklaviert.

Lösung B: 0,42 g MgCl_2

0,14 g MgSO_4

0,34 g CaCl_2

Die Salze wurden in 100 ml dH_2O gelöst und steril filtriert.

Lösung C: 2,25 g NaHCO_3

Das Salz wurde in 100 ml dH_2O gelöst und steril filtriert.

Lösungen A, B, C und dH_2O wurden im Verhältnis 20 : 5 : 5 : 70 gemischt und die fertige Gey's-Lösung bei 4°C aufbewahrt.

2.8. FACS-Analyse von Zellen aus Organen und Zellkultur

Lymphozyten können anhand der Moleküle auf ihrer Oberfläche unterschieden werden. Durch mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper, die spezifisch Antigene auf der Zelloberfläche erkennen, werden Zellen angefärbt und mit einer FACS-Maschine (fluoreszenz-activated-cell-sorter) analysiert (Loken et al., 1975).

Mit dem „forward-scatter“ ist es möglich, die Größe der Partikel zu bestimmen. Dabei liegt der Detektor im 180° Winkel zum Laserstrahl. Durch die Ablenkung des Laserlichtes kann mit dem „side-scatter“ durch Messung des Streulichtes die Granularität bestimmt werden. Dabei liegt der Detektor im 90° Winkel zum Laser. Die Population der Lymphozyten kann so grob definiert und es können Gates (= Fenster) gesetzt werden, die es erlauben, die aufgenommenen Zellen weiter zu differenzieren bzw. auszuwerten.

Nach Lysieren der Erythrozyten wurden die Zellen auf $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Anfärbung verdünnt. Das Zellpellet wurde mit 25 µl der verdünnten fluorochrom-markierten-Antikörperlösung versetzt, 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert und mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen. Zur Analyse wurden die markierten Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen.

Für zweifache und dreifache Anfärbung wurden die Fluorochrome FITC (Fluoroisothiocyanat), PE (Phycoerythrin) und APC (Allophycocyanin) verwendet. Teilweise wurden biotinilierte AK verwendet, die dann in einem 2. Schritt mit Streptavidin-Fluorochromkonjugaten angefärbt wurden.

Es wurde ein FACS-Calibur von Becton Dickinson, Heidelberg, verwendet. Die aufgenommenen Zellen wurden mit CellQuest-Software (Becton Dickinson, Heidelberg) ausgewertet.

2.9. Nachweis von Antikörpern mit ELISA

Um Antikörper im Serum von Mäusen festzustellen, wurde ein ELISA verwendet. Dazu wurden Platten mit Antikörpern beschichtet, die wiederum gegen Maus-Antikörper gerichtet sind. Zum Analysieren unterschiedlicher AK-Isotypen wurden

isotypspezifische AK verwendet. Außerdem wurden mit Antigen beschichtete Mikrotiterplatten zum Nachweis antigenspezifischer AK verwendet. Auch dieser ELISA ließ sich auf den Nachweis des Isotyps spezifischer AK modifizieren.

Die Mikrotiterplatten (Maxisorb[®], Nunc, Wiesbaden) wurden mit 5 µg/ml Ziege-anti-Maus-IgM, -IgG₁, -IgG_{2a} (alle Southern Biotech, Birmingham) beschichtet. Für IgE Nachweise wurde zur Beschichtung der monoklonale AK 84-1.C (Baniyash et al, 1984) mit 10 µg/ml verwendet.

Nach Inkubation von 2 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C wurde mit 200 µl 1 % BSA in PBS über denselben Zeitraum geblockt. Die Platten wurden mit Hilfe eines automatischen Waschgerätes (SLT Labinstruments 96 PW) 5 mal mit Waschpuffer gewaschen. Auf die abgeklopften Platten wurden die Seren in serieller Verdünnung aufgetragen. Eine Reihe wurde als Leerwert von Serum freigehalten. Die Anfangsverdünnungen variierten zwischen 1/10 und 1/100 je nach Nachweisart.

Nach Inkubation und Waschen wurden 50 µl Nachweis-AK, die mit alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt waren, hinzugefügt. Die AK-AP-Konjugate wurden in Diethanolaminpuffer verdünnt. Nach Wegwaschen dieser AK wurden 100 µl des Substrates PNPP in einer Konzentration von 1 mg/ml zugegeben. Die gelbe Farbreaktion konnte mit einem Spektrophotometer für Mikrotiterplatten bei 405 nm gemessen werden.

HRP-gelabelte AK wurden in 0,1 % BSA/PBS verdünnt. Nach Zugabe der Detektionslösung (siehe 1.2.) konnte die entstehende Blaufärbung durch Zugabe von 1 M H₂SO₄ gestoppt werden und es kam zum Farbumschlag nach gelb, der bei 450 nm gemessen wurde.

2.10. Bestimmung der IFN-γ- und IL-4-Konzentration mittels Sandwich-ELISA

Zunächst wurden die Mikrotiterplatten mit 50 µl anti-IFN-γ- bzw. anti-IL-4-Antikörper beschichtet (Konzentration: 5 µg/ml PBS). Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C, und fünfmaliger Behandlung mit einem ELISA-Waschgerät wurden die wells mit 100 µl 1 % BSA/PBS Lösung für eine Stunde bei RT geblockt. Nach

erneutem Waschen wurden die Zellkulturüberstände unverdünnt aufgetragen. Parallel dazu wurde zur Erstellung einer Standardkurve rekombinantes IFN- γ bzw. IL-4 wie folgt aufgetragen:

Eine Lösung des rekombinanten Zytokins mit einer Konzentration von 400 U/ml (IFN- γ) bzw. 50 ng/ml (IL-4) wurde in einer Titrationsreihe 1:3 verdünnt. Nach zweistündiger Inkubation bei RT und erneutem Waschen wurde der nachweisende Antikörper (biotiniliert) in einer Konzentration von 0,5 ng/ml in 0,1 % BSA/PBS aufgetragen und wiederum zwei Stunden bei RT inkubiert. Bevor HRP konjugiertes Streptavidin in einer Verdünnung von 1:2.000 hinzugegeben wurde, mußten die Platten mit einem Waschpuffer ohne Azid gewaschen werden. Nach einstündiger Inkubation bei RT und erneutem Waschen konnten 100 μ l der Detektionslösung hinzugegeben und die Farbänderung beobachtet werden. Nach ausreichender Entwicklungszeit wurde die Reaktion mit 100 μ l konz. Schwefelsäure abgestoppt. Die von blau nach gelb umgeschlagene Farbe konnte nun bei 450 nm gemessen und die erhaltenen OD-Werte analysiert werden.

Die hier verwendeten Antikörper und die rekombinanten Zytokine waren ein Geschenk von Prof. Thomas Brocker, München.

2.11. Immunisierung

Zur Immunisierung von Mäusen haben wir die thymusabhängigen Antigene Ovalbumin (OVA, der Hauptbestandteil des Hühnereiweißes (Sigma)) und Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH, an welches das Hapten Dinitrophenol (DNP) gebunden ist (DNP-KLH von Calbiochem)) verwendet. Zusätzlich wurde jeweils ein Adjuvans verabreicht. Diese Adjuvantien fördern eine spezifische Immunantwort gegen das Antigen.

Die Grundimmunisierung mit OVA erfolgte zusammen mit kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA) (Sigma). Das Immunisieren mit CFA fördert eine vermehrte T_{H1}-Antwort. CFA besteht aus Mineralöl, hitzeinaktivierten Mycobakterien tuberculosis und einem Emulgator. Die cremige Masse muß - um maximalen Effekt zu erreichen

und aufgrund ihrer Toxizität - intradermal oder subcutan injiziert werden. Die Reimmunisierungen erfolgten dann mit inkomplettem Freund'schen-Adjuvans (IFA) (Sigma); hier fehlen die Mycobakterien.

DNP-KLH wurde mit Aluminiumhydroxid (Alum) (Serva) präzipitiert. Die Adsorption des Antigens an Alum ist wichtig, da es zur Depot-Wirkung führt, bei der das Antigen langsam und kontinuierlich freigesetzt wird. Hier wurde bei der Grundimmunisierung das Bakterium *Bordetella pertussis* (Sigma) als Adjuvans verwendet, welches für seine Unterstützung einer T_{H2}-Antwort bekannt ist (Munzo et al., 1981).

Die genauen Immunisierungsprotokolle werden bei den Ergebnissen aufgeführt.

C ERGEBNISSE

1. Herstellung der IgE-knock-in-Mäuse

1.1. Grundlegendes Prinzip der homologen Rekombination und Begriffserklärung

Thomas und Capecchi haben in ihrem Artikel die Grundlagen und Prinzipien des Gene-Targetings beschrieben (Thomas und Capecchi, 1987). Um optimale Resultate erzielen zu können, sollte das Konstrukt einige Eigenschaften besitzen, die ich im folgenden kurz darlegen möchte.

Der 5'-Bereich des zu inserierenden DNA-Fragmentes sollte bis zu 1000 bp groß sein. Diesen Abschnitt des Konstruktes bezeichnet man als „Kurzen Arm“ (KA). Der 3' gelegene Abschnitt des Konstruktes kann bis zu einigen 1000 bp groß sein. Folglich bezeichnet man ihn auch als „Langen Arm“ (LA).

Um für den PCR-Screen der ES-Zell-Klone optimale PCR-Bedingungen austesten zu können, konstruiert man den „Testarm“ (TA). Hierbei liegen alle vier Primerbindungsstellen der Nested-PCR auf dem Plasmid. Dem Kurzen Arm und somit dem eigentlichen Konstrukt fehlt 5' das Stück DNA, auf dem die 5'- Primerbindungsstellen liegen. Dieser Testarm wird in einer hohen Verdünnung (1×10^{-9}) bei dem späteren PCR-Screen als Positivkontrolle mitgeführt.

Bei korrekter Integration des Targetvektors in das Genom bekommt man ein PCR-Signal in der erwarteten Größe.

1.2. Überblick über die grundlegende Strategie des IgE-knock-in

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die grundlegende Strategie des IgE-knock-in. Die Veränderungen im Immunglobulin-Genlocus der Maus sind schematisch dargestellt. Die IgG₁-Exons der löslichen Form wurden durch eine Kopie der Exons des IgE-Isotypes ersetzt. So entstand eine Duplikation des IgE-Gens an der Stelle eines IgG₁-Allels der Maus.

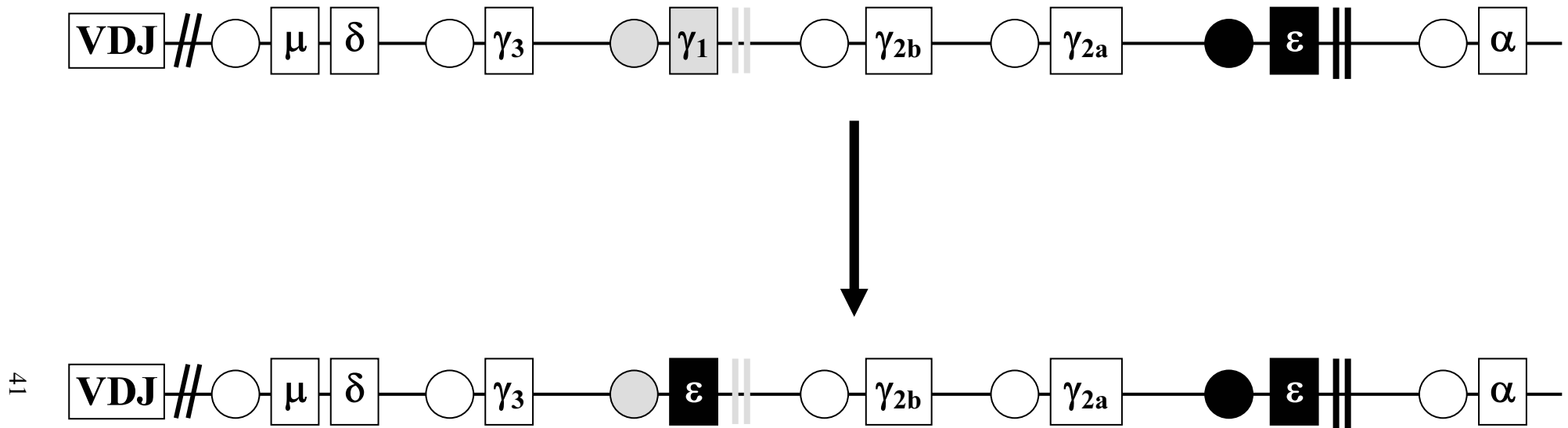


Abb. 4: Schematische Darstellung des murinen Immunglobulin Genlocus vor (oben) und nach (unten) der genetischen Veränderung durch den IgE-knock-in.

 = Exons der löslichen Form des Ak-Isotypes

 = Switch-Region der Isotypen

 = Membranexons

1.3. Klonierung des Testarmes des IgE-knock-in

Als erstes wurde ein 4,1 kb Fragment - geschnitten mit BamH1 und Sal1 - mit der genomischen Sequenz der vier Exons, die für die lösliche Form der Schwere ϵ -Kette codieren, in den entsprechend geöffneten Vektor pCR-Script eingesetzt (pCRScript-IgE).

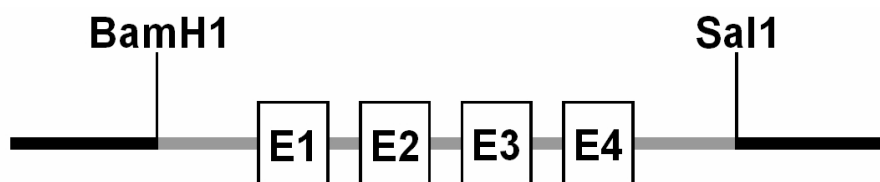


Abb. 5: pCRScript-IgE; Darstellung der in den pCRScript — eingesetzten Exons E1 bis E4 — der Schwere Kette des IgE-Isotypes.

Durch erneutes Schneiden von pCRScript-IgE mit BamH1 konnte ein 1,2 kb BamH1-BamH1-Fragment inseriert werden. Dieses Fragment enthält die „switch-Region“ 5' von IgG₁ und einen kleinen Teil des ersten γ_1 -Exons (vgl. Abb. 6). Somit entstand der fertige Testarm-Vektor (pTA γ_1 /IgE).

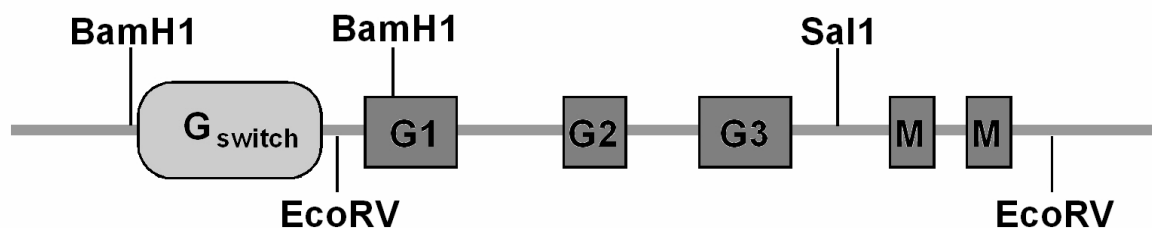


Abb. 6: Schematische Darstellung der genomischen Konfiguration des γ_1 -Locus einer Wildtypmaus mit wichtigen Restriktionsenzymchnittstellen.

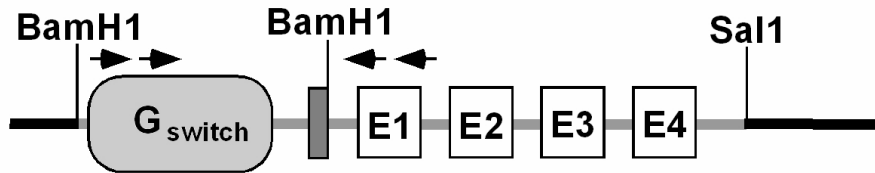


Abb. 7: *pTA γ /IgE*; Gezeigt ist der Testarm des IgE-knock-in. Das 1,2 kb große BamH1-Fragment mit der switch-Region des γ_1 -Locus (vgl. Abb. 6) wurde in den mit BamH1 geöffneten pCRScript-IgE (Abb. 5) vor die Exons der ϵ -Kette eingefügt. Die Pfeile symbolisieren Primerbindungsstellen für spätere PCR-Experimente.

1.4. Klonierung des IgE-knock-in-Konstruktes

Der Kurze Arm (KA) für die homologe Rekombination wurde mit PCR synthetisiert, wobei durch das spezielle Primerdesign zwei BamH1-Sites so eingefügt wurden, daß bei dem entstehenden 800 bp-Stück im Vergleich zum 1,2 kb-Fragment des Testarmes der Teil des γ_1 -Exons und 5' ca. 200 bp wegfielen. Auf diesen 200 bp liegen die 5' Primerbindungsstellen des Testarmes.

P KA BamH1 u: 5'-acgGGATCCCCTGGGGCAGTGTGAA-3' und

P KA BamH1 l: 5'-cgcGATCCCCTGTCAGACAGGACAGGACAGG-3'

(Unterstrichen ist jeweils die Erkennungssequenz für die de novo eingefügte BamH1-Site; *kursiv* dargestellt ist die genomische Sequenz; kleine Buchstaben stellen unspezifischen DNA-Überhang dar, den das Restriktionsenzym zum Binden an das PCR-Fragment benötigt.)

PCR-Bedingungen:

1. 94°C 3 min - 1mal
2. 94°C 55 sec
- 56°C 55 sec - 35mal
- 72°C 1 min 30 sec
3. 72°C 5 min - 1mal

Dieses Fragment wurde - nach Verdau mit BamH1 - in den mit BamH1 geschnittenen pCRScript-IgE ligiert. Es entstand pKA γ_1 /IgE.

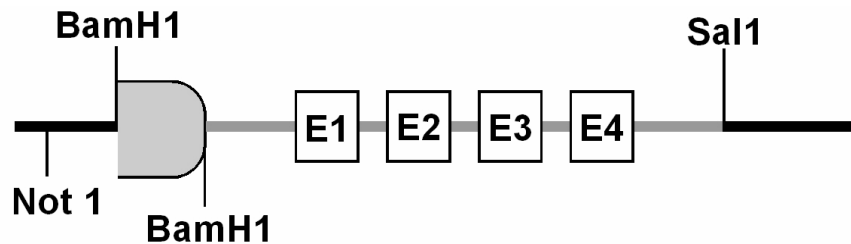


Abb. 8: pKA γ_1 /IgE; Dargestellt ist pCRScript-IgE (Abb. 5) mit den vier IgE-Exons, vor die das mittels PCR amplifizierte 800 bp BamH1-Fragment des Kurzen Armes gesetzt wurde.

Für den Langen Arm (LA) wurde aus der DNA der γ_1 -Kette mit EcoRV ein 5,6 kb großes Fragment isoliert. Dieses Stück beinhaltet die 3 Exone der Schweren γ_1 -Kette und ihre dazugehörenden 2 Membranexons. Es wurde in den Vektor pneotk2loxP (Xho1 geöffnet und „blunt gemacht“ (vgl. Material und Methoden 2.1.8.)) ligiert (pneotk2loxP-LA γ_1). Zwischen die Strukturexone der γ_1 -Kette und die beiden Membranexons wurde in die Sal1-Site (vgl. Abb. 6) eine loxP-Site eingesetzt (pneotk2loxP-LA γ_1 /loxP).

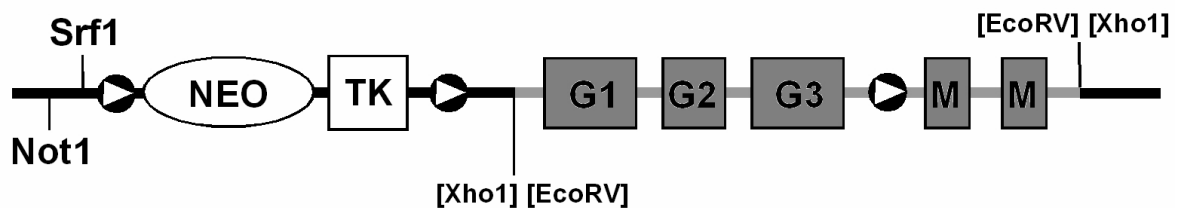


Abb. 9: pneotk2loxP-LA γ_1 /loxP; Darstellung des Langen Arms des Konstruktes. In den geöffneten pneotk2loxP — wurde das DNA-Fragment mit den IgG₁ Struktur- und Membranexons inseriert —. Zwischen die IgG₁-Struktur- und Membranexons wurde eine weitere loxP-Site ● eingefügt.

Da bei der 100 bp großen loxP-Kassette auf die Orientierung geachtet werden muß, haben wir die richtige Integration mit PCR überprüft.

P 80 5'-CCAGCGGAGAACTACAAGAA-3' und

P 81 5'-CGAAGTTATTAGGTCTGAAG-3'

PCR-Bedingungen:

1. 94°C 3 min - 1mal
2. 94°C 58 sec
58°C 55 sec - 35mal
72°C 1 min
3. 72°C 5 min - 1mal

Schließlich wurde der pKA γ_1 /IgE (Abb. 8) mit Sal1 geschnitten, blunt gemacht und anschließend mit Not1 verdaut. Das entstandene Fragment (Teil der „switch-region“ für γ_1 und die vier Exons der ϵ -Kette) wurde in den mit Not1 und Srf1 geöffneten pneotk2loxPLA γ_1 /loxP eingesetzt.

Mit diversen Restriktionsenzymen und Sequenzierung wurde das fertiggestellte Konstrukt (pIgEkin) genau analysiert.

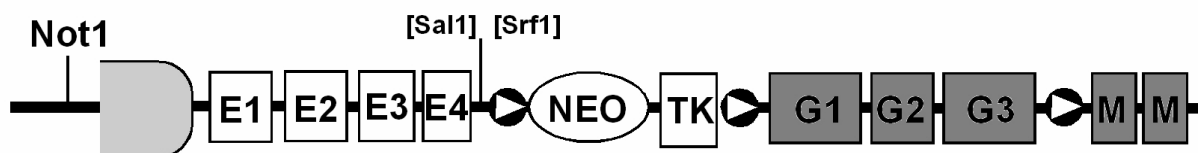


Abb. 10: pIgEkin; schematische Gesamtdarstellung des zur homologen Rekombination verwendeten Konstruktes.

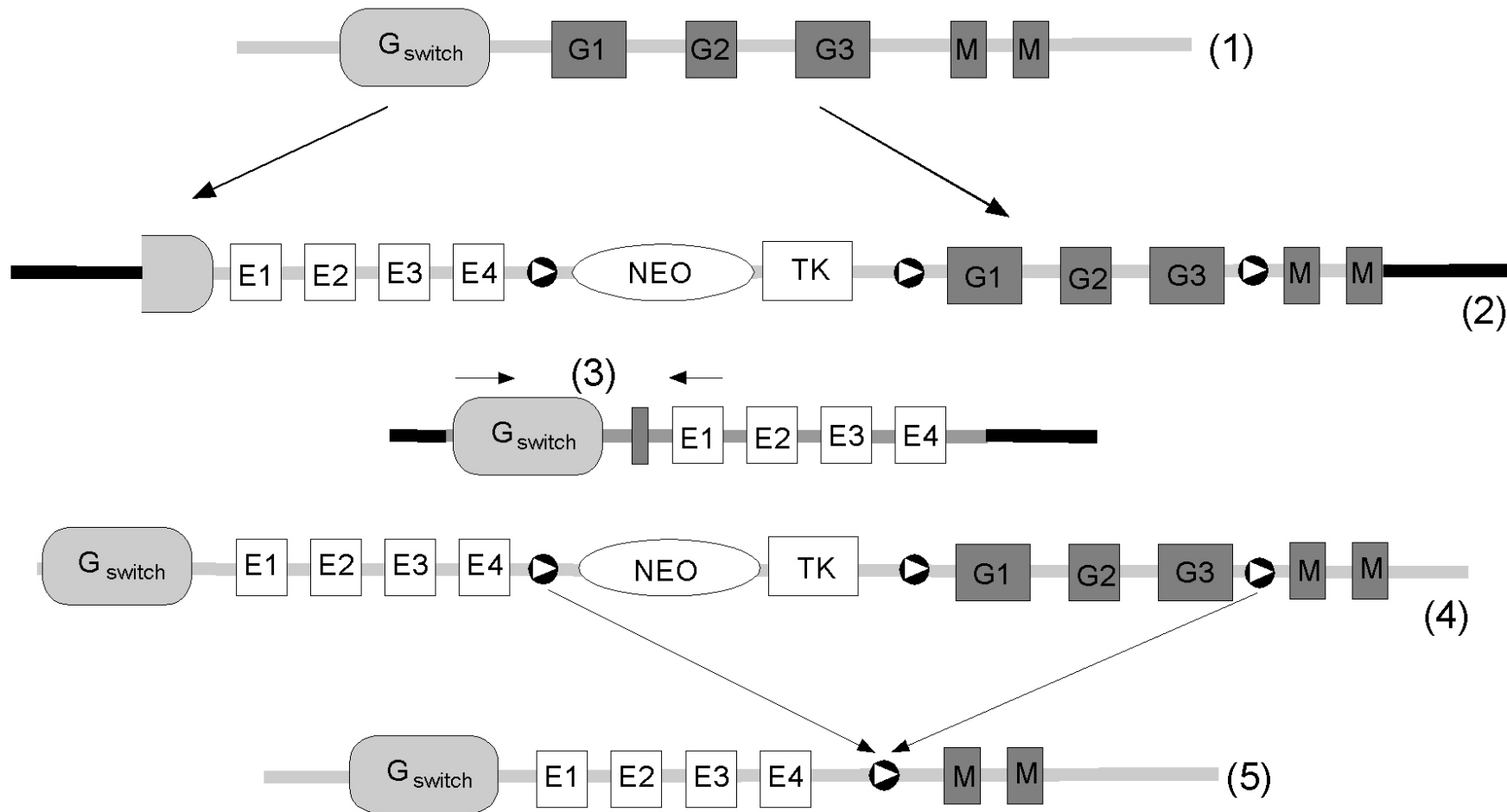


Abb. 11: Übersicht der IgE-knock-in-Strategie. Die Nummern 1 bis 5 bezeichnen die einzelnen Schritte von der Klonierung bis zum mutierten Allel der IgE-knock-in-Maus

1. Genomische Konfiguration des γ -Locus mit den 3 Exons (G1 bis G3) und den beiden Membranexons M
2. Fertiggestelltes Konstrukt mit den Exons 1-4 der ϵ -Kette, den Exons G1-G3 und der Selektionskassette neo/tk
3. Testarm mit angedeuteten Primerbindungsstellen für Screening-PCR
4. Genomische Konfiguration einer IgE-knock-in-Maus vor cre-vermittelter Deletion der Selektionskassette und den γ -Exons
5. Mutiertes Allel einer IgE-knock-in-Maus nach cre-Deletion

1.5. Überprüfung der drei loxP-Sites auf ihre Funktionalität

LoxP-Sites sind 34 bp große Erkennungssequenzen für eine Rekombinase, die „cre-Rekombinase“. Diese Rekombinase ist ein 38 kDa-Genprodukt aus dem Bakteriophagen P1. Sie katalysiert eine von der Orientierung der beiden loxP-Sites abhängige Rekombination. Bei gleichgerichteter Orientierung von zwei loxP-Sites wird die dazwischenliegende DNA herausgeschnitten, bei entgegengesetzter Orientierung erfolgt eine Inversion des von loxP-Sites flankierten DNA-Abschnittes (Sauer, 1998).

Die Funktionalität der drei loxP-Sites wurde durch Transformation des Konstruktes in cre exprimierende Bakterien (BNN132) überprüft. Dabei interessiert vor allem, ob die beiden „außen“ liegenden loxP-Sites funktionieren, d. h. ob die neo/tk-Kassette und die drei Exons der γ_1 -Kette komplett deletiert werden können.

Die folgende Abbildung stellt das Konstrukt mit EcoRI und EcoRV verdaut dar, das durch cre vermittelt die neo/tk-Kassette und die 3 γ_1 -Exons verloren hat - also eine „komplette“ cre-Deletion. Daneben zeige ich das postulierte Bandenmuster (Gene construction kit 2[®] (GCK)).

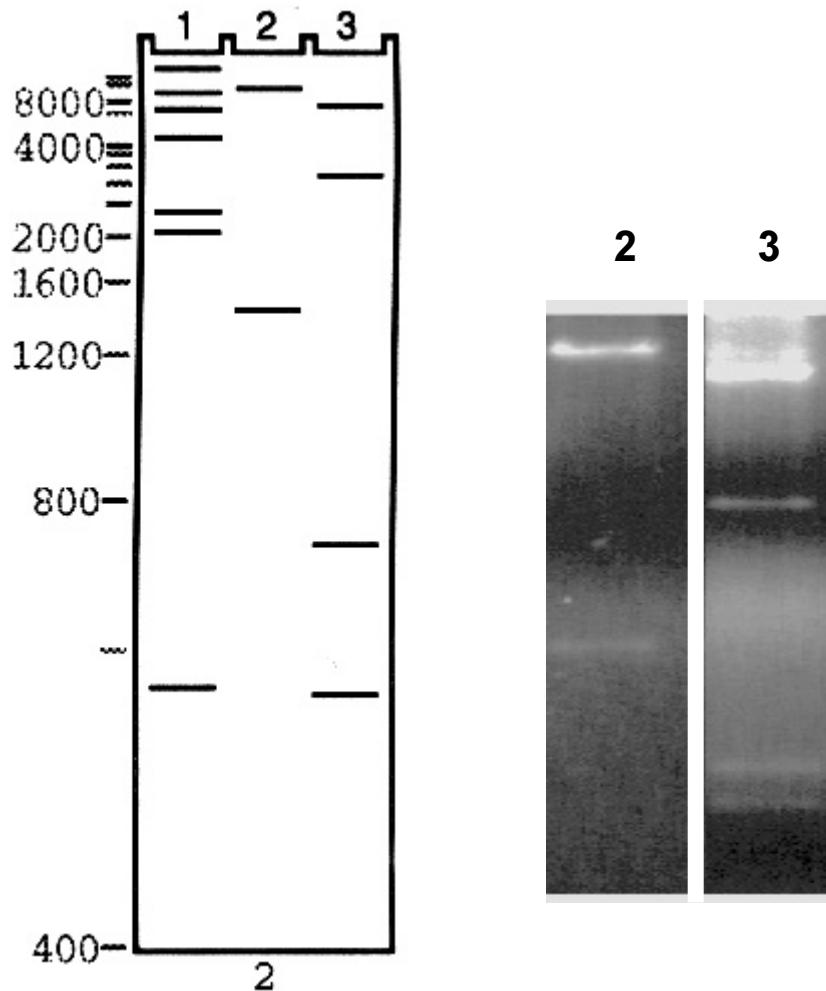


Abb. 12: Überprüfung der Funktionalität der *loxP*-Sites. Durch *cre* vermittelte Rekombination der beiden „äußeren“ *loxP*-Sites (vgl. Abb. 10) erfolgte die Deletion der 3 γ_1 -Exons und der *neo/tk*-Kassette des in *cre*-exprimierende Bakterien transformierten Konstruktes *pIgE*. Links ist das postulierte Bandenmuster (*GCK*[®]-Ausdruck), rechts sind Ausschnitte aus den Gelen mit den *EcoRI*- und *EcoRV*-Verdauen zu sehen.

Bande 1: DNA-Marker (λ -Phage mit *Hind III* verdaut)

Bande 2: *pIgE* nach kompletter *cre*-Deletion mit *EcoRI* verdaut.

Bande 3: *pIgE* nach kompletter *cre*-Deletion mit *EcoRV* verdaut.

1.6. Transformation des Konstruktes in ES-Zellen und PCR-Screen

Im folgenden ist wegen der Bedeutung für die gesamte hier vorgelegte Arbeit die Transformation der ES-Zellen in allen methodischen Details aufgeführt.

Das linearisierte Plasmid wurde mit einem Genepulser in Balb/c-1- und E14.1-ES-Zellen transformiert.

Nach Selektion mit dem Antibiotikum G418 (= Neomycin) konnten insgesamt ca. 800 Klone isoliert werden, die mit einer nested-PCR (vgl. Material und Methoden 2.3.7.) auf korrekte Integration hin überprüft wurden.

Dabei wurden für die ersten Amplifikationsschritte mit den Primern 76 (5'-TTGAGGACAGAATGGTGAGAT-3') und 75 (5'-TCGTGACAGAAGGTGGTAGTG-3') folgende Bedingungen gewählt:

1. 94°C 3 min 10 sec - 1mal
2. 94°C 50 sec
53°C 55 sec - 24mal
72°C 1 min 10 sec
3. 72°C 5 min - 1mal

Die zweite PCR mit den „inneren“ Primern 77 (5'-CTAAACCCAAACACAGACCTA-3') und 74 (5'-TCAACCTACAAACGGAAAGAA-3') benötigte folgende Konditionen:

1. 94°C 3 min 40 sec - 1mal
2. 94°C 45 sec
53°C 50 sec - 35mal
72°C 1min 15 sec
3. 72°C 5 min - 1mal

Es fanden sich 4 positive Klone; je zwei aus den verschiedenen ES-Zelllinien.

Screen mit Balb/c-1-ES-Zellen

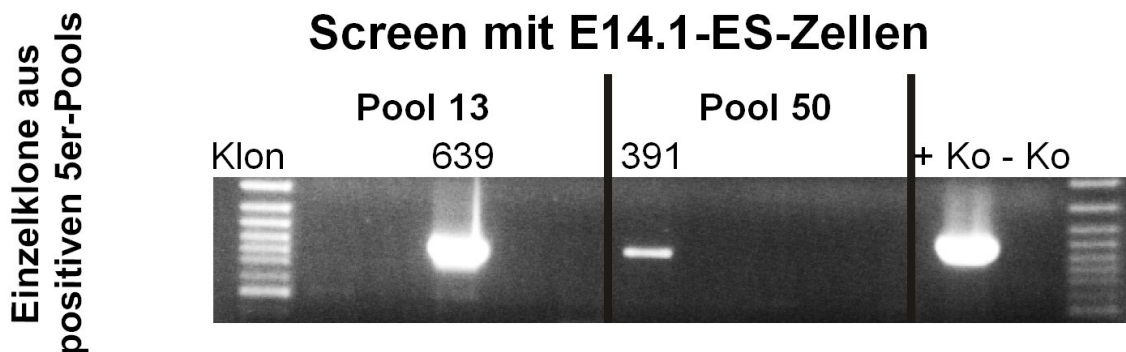
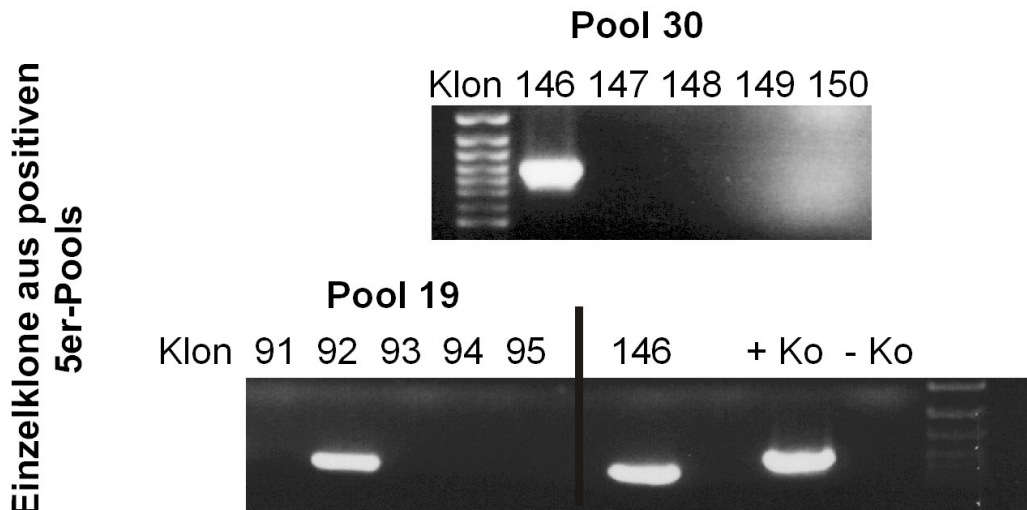
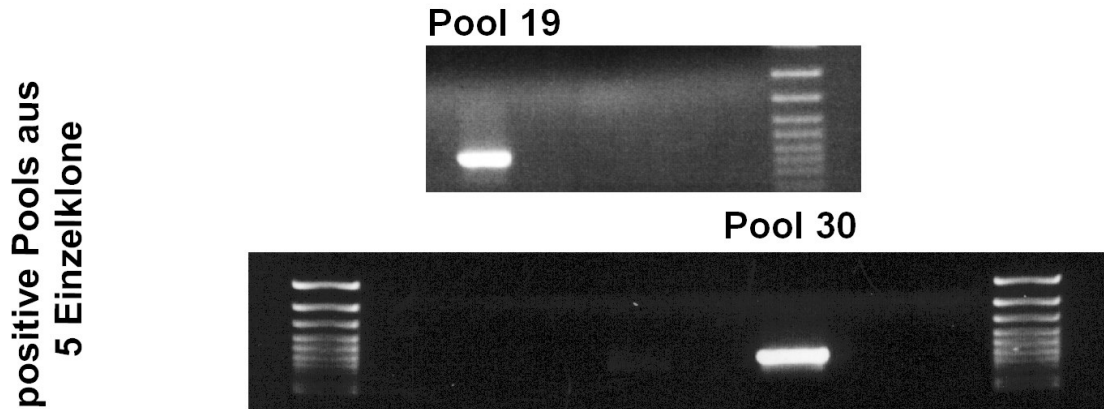


Abb. 13: Dargestellt sind Abbildungen der Screening-PCRs. Neben den positiven 5er-Pools (Pool 19 u. 30) der Balb/c-1-ES-Zelllinie sind die einzelnen positiven Klone (Nr. 92 und 146) zu sehen. Im unteren Abschnitt sind die positiven Klone Nr. 391 und 639 der E14.1-ES-Zelllinie gezeigt.

Als Positivkontrolle wurde der Testarm 1×10^{-9} verdünnt. Der geringe Größenunterschied der Banden erklärt sich durch die Klonierung (vgl. Abb. 7).

1.7. Überprüfung der korrekten Integration des Konstruktes in das Genom der Maus mittels Southern-Blot

20 µg genomische DNA von PCR-positiven-Klonen wurden mit Xmn1 und Sph1 verdaut. Als radioaktiv markierte Probe habe ich das für den Kurzen Arm synthetisierte 800 bp BamH1-Fragment verwendet (vgl. Abb. 8).

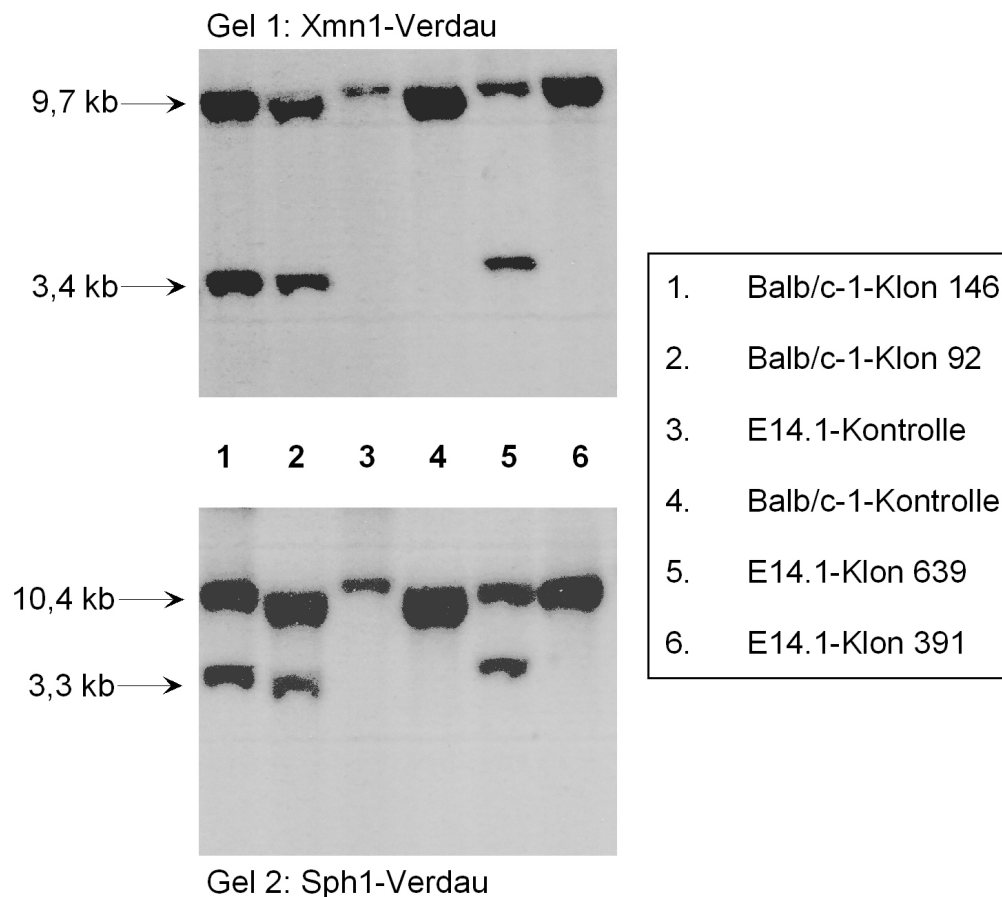
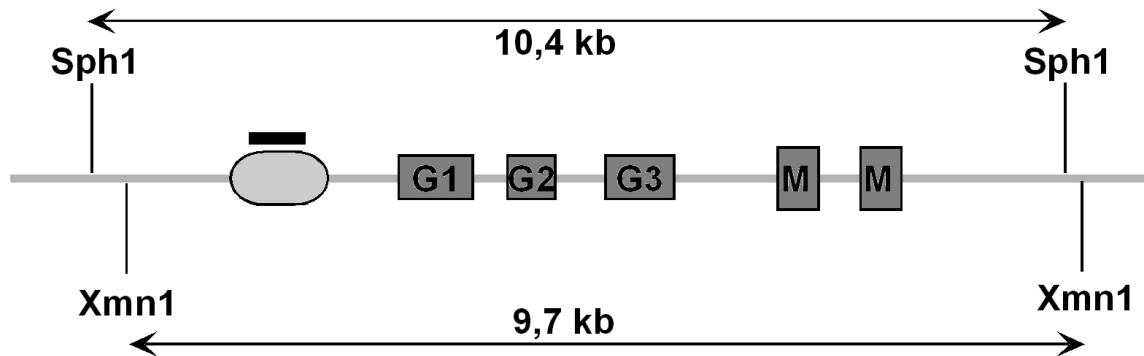


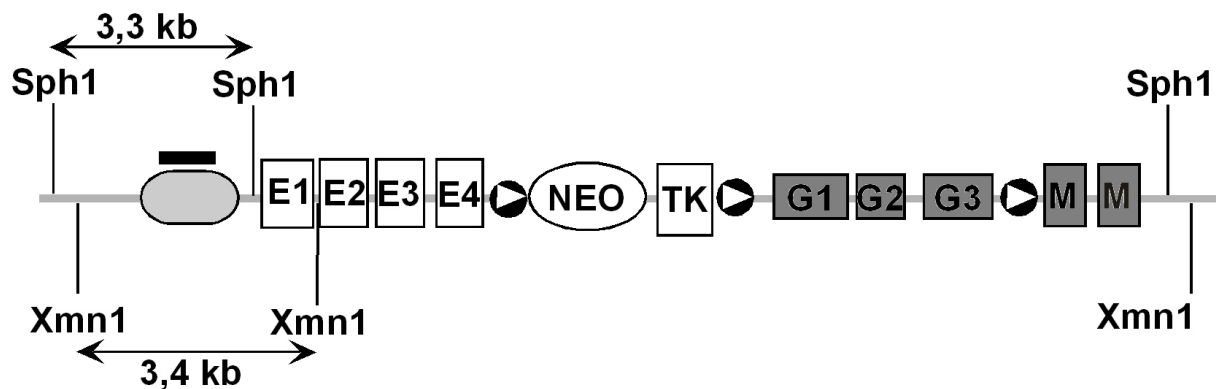
Abb. 14: Dargestellt sind zwei Southern-Blots, die die korrekte Integration des Konstruktes in das murine Genom nachweisen. In der oberen Abbildung wurde DNA mit Xmn1, in der unteren mit Sph1 verdaut. Als radioaktiv markierte Probe fungierte das 800 bp PCR-Fragment, das für den Kurzen Arm synthetisiert wurde (vgl. Abb. 8). Die Nummern 1 - 6 repräsentieren die zu untersuchenden PCR-positiven-Klone und die Kontrollen (Nr. 3 u. 4).

Anhand des Southern-Blots konnte man erkennen, daß der PCR-positive-E14.1-Klon Nr. 391 nicht die korrekte Integration aufwies.

genomische Konfiguration des IgG₁-WT-Allels



genomische Konfiguration des IgE-knock-in



— = Probe (800 bp PCR-Fragment für Kurzen Arm)

Abb. 15: Schematische Darstellung der genomischen Konfiguration vor und nach Insertion der IgE-Exons u. neo/tk-Kassette. Zudem sind die Sph1 und Xmn1 Schnittstellen für den Southern-Blot eingezeichnet. Weiters ist die erwartete Größe der Banden des Southern-Blots angegeben.

1.8. Blastozysteninjektion und Geburt chimärer Mäuse

Die Technik der Veränderung von Genomen durch homologe Rekombination in vitro hat sich als eine außergewöhnlich erfolgreiche Methode erwiesen, die Funktion einzelner Gene am lebenden Organismus untersuchen zu können.

Die ES-Zellen mit dem oben beschriebenen Konstrukt wurden in Blastozysten (C57BL/6) injiziert. Durch die weiße Farbe des Fellteiles, das von der mutierten ES-Zelle stammte, war es leicht möglich, den Chimärismus abzuschätzen, da die schwarzen Teile des Felles vom Blastozysten abstammen.

Unter den chimären Mäusen des positiven E14.1-ES-Zell-Klones Nr. 639 war kein Keimbahntransmitter. Die aus den Balb/c-1-ES-Zellen hervorgegangenen chimären Mäuse gaben ihre Mutation an die Nachkommen weiter. Dies erkannte man daran, daß nach Verpaarung mit C57BL/6-Mäusen braune Mäuse geboren wurden.

Schließlich wurden die knock-in-Mäuse mit sog. cre-Deleter-Mäusen (Schwenk et al., 1995) verpaart, um die neo/tk-Kassette und die 3 γ_1 -Exons zu eliminieren.



Abb. 16 : Abbild einer chimären Maus, die nach Injektion einer mutierten Balb/c-1-ES-Zelle in einen C57BL/6-Blastozysten und Reimplantation der so manipulierten Blastozyste in den Uterus einer scheinschwangeren Maus geboren wurde.

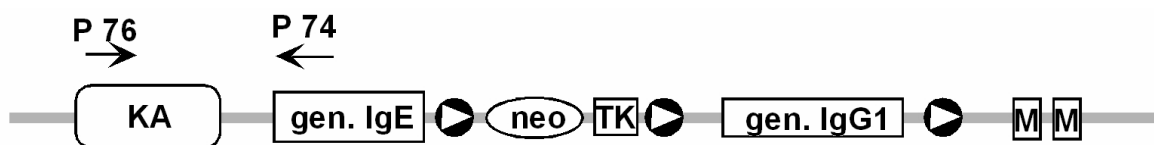
1.9. Identifikation der genetisch veränderten Tiere

Mit der PCR B (Primer 167 und Primer 46 - siehe Material und Methoden 1.6.) wurden diejenigen Mäuse identifiziert, deren neo/tk-Kassette und die 3 γ_1 - Exons deletiert wurden. Anschließend wurden die Mäuse mit Balb/c-Mäusen weiter verpaart. Ziel hierbei ist es, den genetischen Hintergrund der C57BL/6-Mauslinie zu reduzieren. Dies ist insbesondere deswegen wichtig, weil zwischen den Mausstämmen verschieden hohe Konzentrationen von IgE bei nicht immunisierten Mäusen nachgewiesen werden können (Chiorazzi et al., 1977).

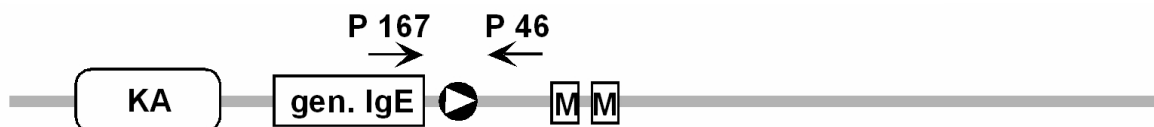
Die genaue Typisierung erfolgte mit den drei PCR's, die in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt sind.

Des weiteren wird eine Abbildung einer beispielhaften Verpaarung einer Maus mit heterozygotem IgE-knock-in ohne cre-Deletion mit einer Maus mit heterozygotem IgE-knock-in mit kompletter cre-Deletion gezeigt (PCR-C).

PCR A: Nachweis des Konstruktes vor cre-Deletion



PCR B: nach kompletter cre-Deletion



PCR C: Nachweis der inserierten loxP-Site

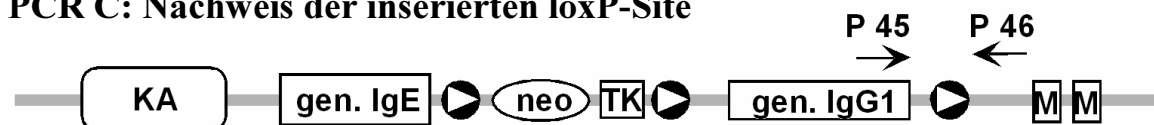


Abb. 17: Schematische Darstellung der Typisierungs-PCRs. PCR A identifiziert Mäuse, die die genetische Veränderung in ihrem Genom tragen. PCR B gibt ein positives Signal nach kompletter cre-Deletion. Mit PCR C kann durch den Größenunterschied zum WT die inserierte loxP-Site nachgewiesen werden.





| | Allel A / WT | | X | Allel B / WT | |
|------------------|---|---|---|--|---|
| Genotyp der Maus | WT / WT | Allel B / WT | | Allel A / Allel B | Allel A / WT |
| PCR A: | ⊖ | ⊕ | | ⊕ | ⊕ |
| PCR B: | ⊖ | ⊕ | | ⊕ | ⊖ |
| PCR C: |  |  | |  |  |
| | | | | | ↓ Laufrichtung des Geles |

Abb. 18: Schematische Darstellung, wie mit den 3 PCRs A - C die genetisch veränderten Mäuse eindeutig identifiziert werden konnten. Allel A trägt das Konstrukt vor *cre*-Deletion, Allel B das Konstrukt nach kompletter *cre*-Deletion.

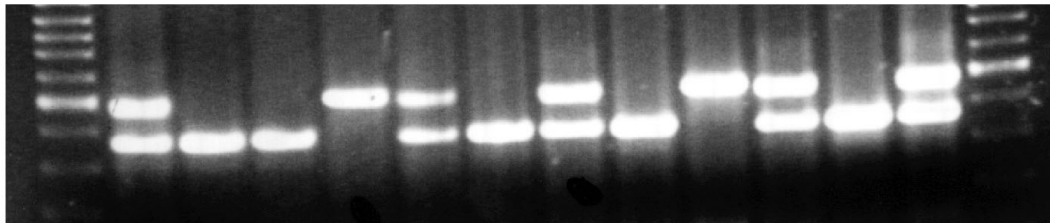


Abb. 19: Ausschnitt aus einem Foto einer Typisierungs-PCR C (vgl. Abb. 17 u. 18); Verpaarung von heterozygotem IgE-knock-in ohne *cre*-Deletion (Allel A/WT) mit heterozygotem IgE-knock-in mit kompletter *cre*-Deletion (Allel B/WT).

2. Phänotypische Analyse der (*heterozygoten* !) IgE-knock-in-Mäuse

2.1. Bestimmung der Immunglobuline im Serum von unbehandelten IgE-knock-in-Mäusen

Durch Bestimmung der IgE-Spiegel im Serum der genetisch veränderten Mäuse sollte untersucht werden ob der knock-in funktionell ist, d.h. das IgE-Gen an der Position des IgG₁-Genes transkribiert und translatiert wird.

Hierfür nahmen wir Blut von nicht immunisierten 8 Wochen alten WT- und IgE-knock-in-Mäusen. Die Mäuse waren unter spezifischen pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten worden. Für die exakte Bestimmung der Immunglobuline ist das Alter ebenso wichtig wie die Gesundheit der Tiere. Besonders die IgE-Synthese ist stark altersabhängig. So zeigen ältere Tiere höhere Konzentrationen von IgE im Serum als junge Mäuse (Pfeffer, K., GSF Neuherberg; persönliche Kommunikation).

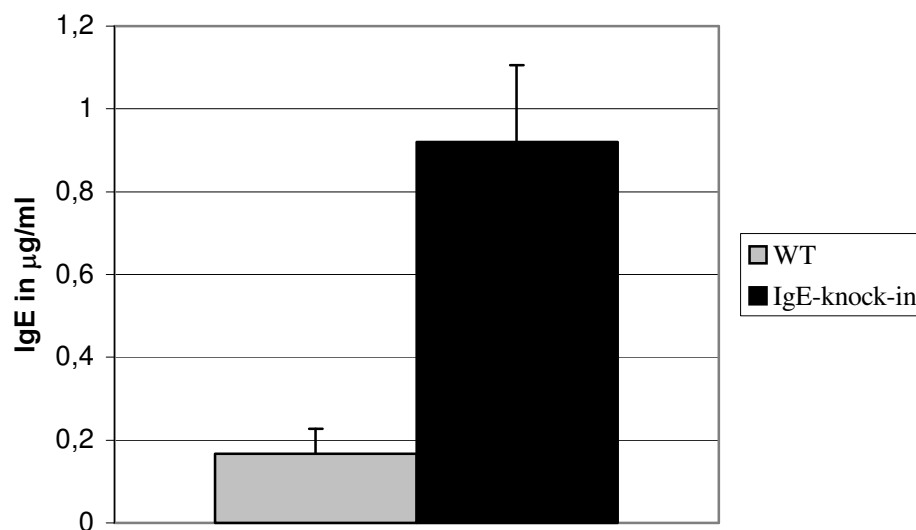


Abb. 20: Dargestellt sind die Serumabsolutwerte für IgE in µg/ml von nicht immunisierten WT- und IgE-knock-in-Mäusen.

Die IgE-knock-in-Mäuse produzierten ca. 5mal mehr IgE als WT-Mäuse. Die Absolutwerte hierfür betrugen durchschnittlich bei den WT-Mäusen 0,18 µg/ml, bei den IgE-knock-in-Mäusen 0,92 µg/ml. Bei den übrigen untersuchten Isotypen fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

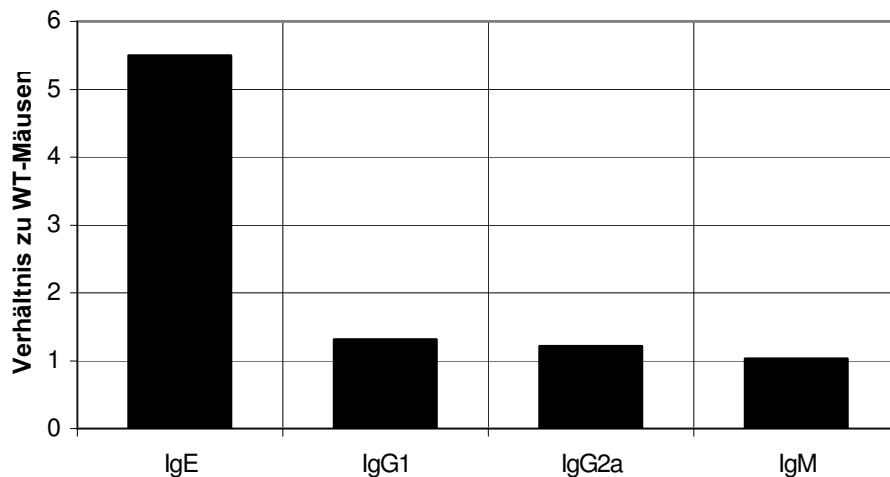


Abb. 21: Gezeigt ist das Verhältnis der unterschiedlichen Immunglobulin-Isotypen nicht immunisierter IgE-knock-in-Mäuse zu denen von WT-Mäusen.

Die Werte wurden mit Hilfe von ELISAs bestimmt. Abb. 21 zeigt die Immunglobulin-Werte von IgE-knock-in-Mäusen bezogen auf die Normalwerte von Wildtyp-Kontrollen.

2.2. In-vitro-Stimulation von Milzzellen aus IgE-knock-in-Mäusen

Dieses Experiment sollte zeigen, daß die Induktion von IgE in den IgE-knock-in-Mäusen homolog zu IgG₁ erfolgt und somit die Funktionalität der regulatorischen Elemente, die normalerweise zur IgG₁-Produktion führen, belegen.

Vorexperimente von Snapper et al. mit Milzzellkulturen von WT-Mäusen zeigten, daß nach Inkubation mit LPS (Lipopolysaccharid) und einer steigenden Menge an IL-4 in der Zellkultur eine stetige Zunahme von IgG₁ zu verzeichnen ist. IgE sollte erst bei

hohen Konzentrationen (500 U/ml) von IL-4 gut nachzuweisen sein (Snapper et al., 1987; Snapper et al., 1988).

Je 1×10^6 Milzzellen/ml von je drei heterozygoten IgE-knock-in-Mäusen und Kontrollmäusen wurden in LPS-haltigem (15 µg/ml) Medium kultiviert, einige erhielten zusätzlich IL-4 (50 U/ml oder 500 U/ml). Am Tag 6 nach Inkubationsbeginn wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA auf AK der verschiedenen Isotypen untersucht.

Im Vergleich zum WT fand sich durch 500 U/ml IL-4 eine 7fache Zunahme der IgE-Produktion. Bei alleiniger LPS-Stimulation oder LPS + 50 U/ml IL-4 zeigte sich bei IgE-knock-in-Milzzellen eine deutliche IgE-Antwort, bei den WT-Mäusen war kein IgE zu detektieren.

Bei IgG₁ fand man zwar unter Stimulation von IL-4 eine Zunahme der Produktion von IgG₁, aber die Werte von IgE-knock-in und WT unterschieden sich nicht wesentlich. Insbesondere war die IgG₁-Produktion der IgE-knock-in-Milzzellen nicht erniedrigt.

Die Milzzellen von IgE-knock-in-Mäusen zeigten eine deutlich höhere IgG_{2a}-Produktion als die WT-Milzzellen. So war die Konzentration von IgG_{2a} bei LPS + 50 U/ml IL-4 stimulierten IgE-knock-in-Milzzellen 12mal höher als bei WT-Zellen. Bei LPS alleine und LPS + 500 U/ml IL-4 zeigten sich sogar 30fache Unterschiede.

Für IgM waren bei alleiniger Stimulation mit LPS und Stimulation mit LPS und 50 U/ml IL-4 bei WT- und IgE-knock-in-Mäusen annähernd gleiche Werte zu messen. Durch Zugabe von 500 U/ml IL-4 ließ sich die Produktion bei WT- und IgE-knock-in-Milzzellen gleichermaßen unterdrücken.

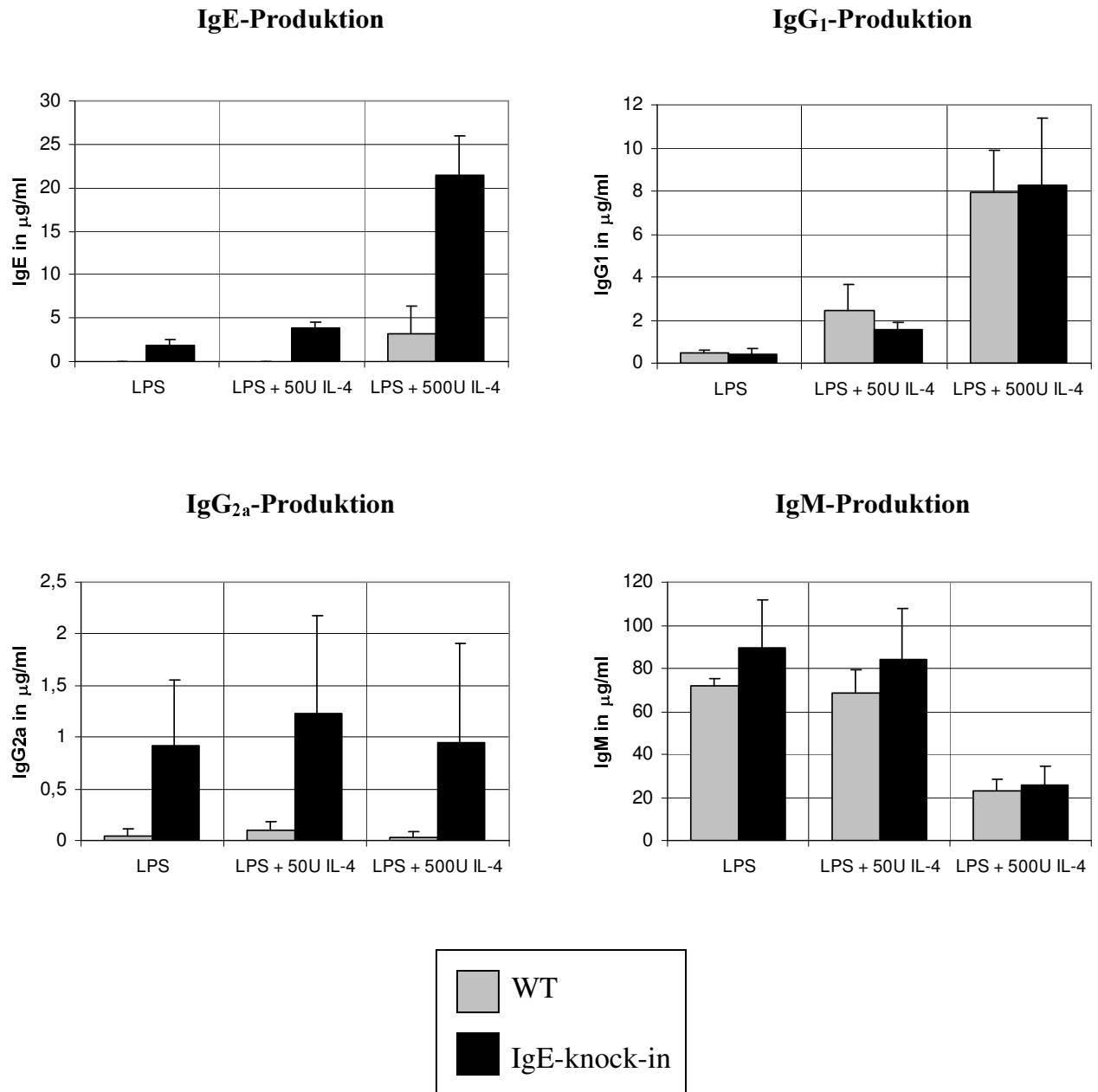


Abb. 22: Immunglobulin-Produktion nach in-vitro-Stimulation mit LPS \pm IL-4. Je 1×10^6 Milzzellen von je 3 Mäusen wurden 6 Tage mit LPS alleine ($15 \mu\text{g/ml}$) oder mit zusätzlich 50 U/ml bzw. 500 U/ml IL-4 stimuliert. Antikörper im Überstand wurden mit ELISA nachgewiesen und mittels eines Standards quantifiziert.

Um herauszufinden, ob die Änderung der Ig-Produktion mit der Zellzahl parallel einhergeht, haben wir 1×10^5 Zellen jeder Gruppe mittels Cytospin auf Objektträger fixiert und mit Peroxidase markierten Antikörpern gegen IgE, IgG₁, IgG_{2a} und IgM gefärbt. Die Auszählung der angefärbten Zellen ist im Folgenden wiedergegeben.

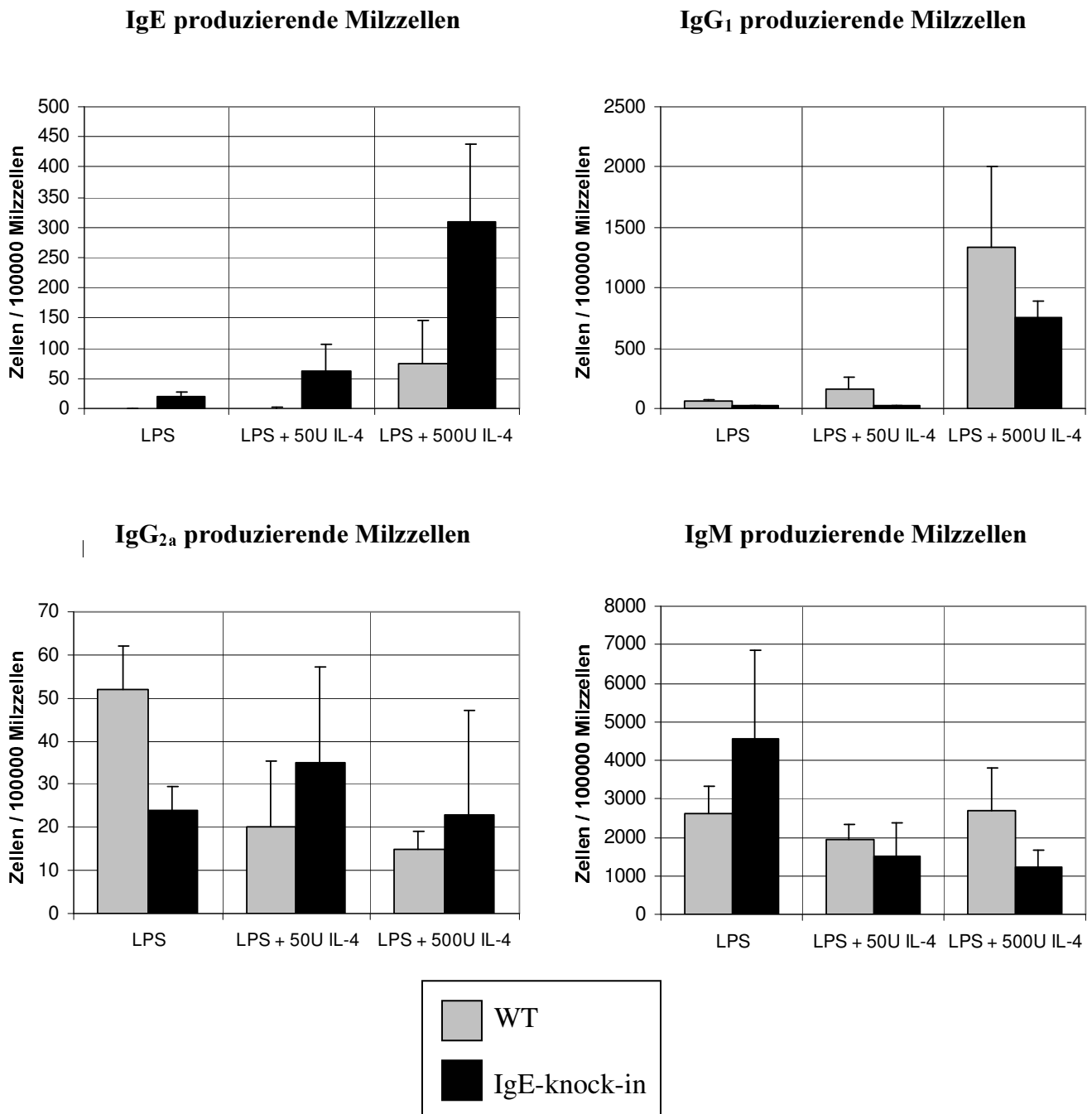


Abb. 23: In-vitro-Stimulation von Milzzellen mit LPS \pm IL-4. Milzzellen von je 3 Mäusen wurden 6 Tage mit LPS alleine (15 μ g/ml) oder mit zusätzlich 50 U/ml bzw. 500 U/ml IL-4 stimuliert. Je 1×10^5 Milzzellen wurden dann auf Objektträger fixiert und mit Peroxidase markierten AK gefärbt und ausgezählt.

Die IgE-Menge im Überstand verlief parallel zur Anzahl IgE-produzierender-Zellen. Es fiel auf, daß die deutlich höheren IgG_{2a}-Mengen im Überstand nicht mit der Zellzahl der IgG_{2a}-produzierenden-Zellen korrelieren. Außerdem fand man im Vergleich zur WT-Milz deutlich weniger IgG₁-produzierende-Zellen in der Milz der IgE-knock-in-Mäuse. Mit anti-IgM ließen sich bei WT-Milzzellen annähernd gleich viele Zellen anfärben. Bei den IgE-knock-in-Milzzellen konnte bei Zugabe von 50 U/ml IL-4 eine Abnahme der IgM-produzierenden-Zellzahl auf 1/3 verzeichnet werden.

2.3. Immunisierung mit thymusabhängigen Antigenen

Thymusabhängige Antigene induzieren Antikörper unterschiedlicher Isotypen. Dies erfordert die Mithilfe von T-Helferzellen, z. B. durch Zytokine. Spezifische T-Zellen interagieren mit spezifischen B-Zellen und aktivieren diese, was schließlich zur Produktion spezifischer Antikörper führt.

Reimmunisierungen (boost) sind zur Bestimmung einer Sekundärantwort vonnöten. Um nicht nur absolute Änderungen der AK-Konzentration zu erfassen, sondern auch einen Wechsel in der Kinetik der AK-Bildung, haben wir an verschiedenen Tagen Blut abgenommen. Die Seren der Mäuse wurden mit antigenspezifischen ELISAs auf die verschiedenen Ig-Isotypen untersucht. Es konnten bei der Messung der antigenspezifischen Antikörper keine absoluten Mengen angegeben werden, da keine spezifischen Standards vorhanden waren.

Die ELISA-Platten wurden mit 50 µg/ml Antigen (abhängig von der Immunisierung) beschichtet.

Nach Immunisierung kann die spezifische Immunantwort zwischen IgE-knock-in- und WT-Mäusen verglichen werden.

Die Immunisierungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt.

| Tag 0 | Tag 12 | Tag 14 | Tag 20 | Tag 28 | Tag 30 | Tag 34 |
|--------------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|----------|--------------|
| Grundimmunisierung | Blutabnehmen | 1. boost (≡ Reimmunisierung) | Blutabnehmen | Blutabnehmen | 2. boost | Blutabnehmen |

Wir immunisierten mit zwei verschiedenen Antigenen. 1. OVA (Ovalbumin) und 2. DNP-KLH (KLH (Keyhole-Limpet-Hämocyanin) als Proteinantigen und das daran gekoppelte DNP (Dinitrophenol)). Als Adjuvantien haben wir entweder CFA (komplettes Freund'sches-Adjuvans) oder Alum (Aluminiumhydroxid) verwendet, die für ihre Fähigkeit bekannt sind, verschiedene T-Helferzell-Subpopulationen zu fördern.

2.3.1. Immunisierung mit Ovalbumin (OVA) und komplettem Freund'schen-Adjuvans (CFA)

Präparation von OVA (Ovalbumin, Hauptbestandteil des Hühnereiweißes) für die Grundimmunisierung (vgl. Material und Methoden 2.11.):

CFA (komplettes Freund'sches-Adjuvans) und OVA wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, bis eine cremige Emulsion entstand. Jeder Maus wurden 50 µg OVA in 150 µl Emulsion s. c. verabreicht.

Die Reimmunisierungen (boosts) fanden mit den gleichen Mengen an Antigen statt. Als Adjuvans wurde IFA (Inkomplettes Freund'sches-Adjuvans - hier fehlen die Mycobakterien) verwendet.

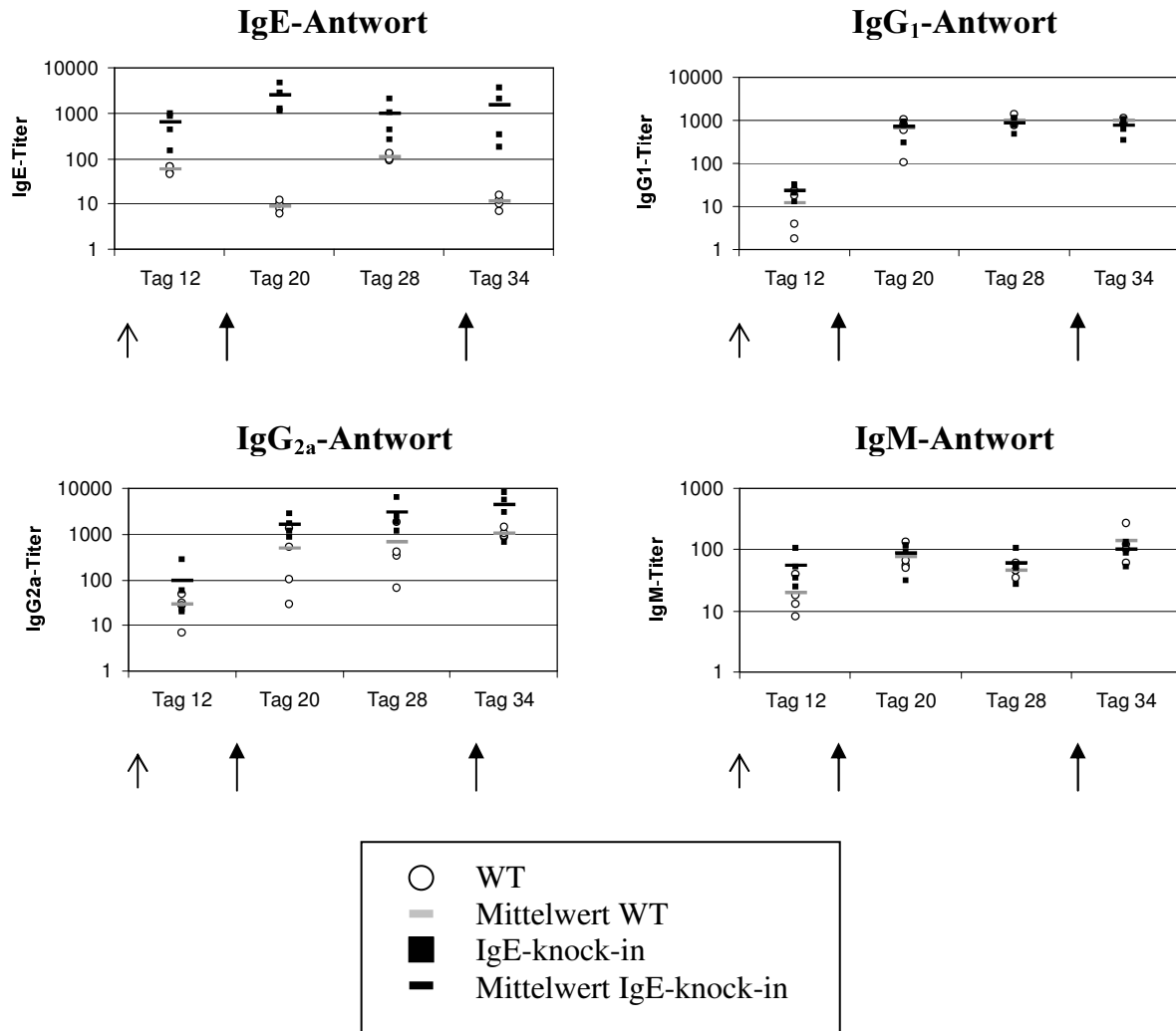


Abb. 24: Dargestellt ist die Immunisierung mit 50 µg OVA pro Maus s. c. und CFA als Adjuvans und der beobachtete Immunglobulin-Titerverlauf. Pro Gruppe wurden 4 Mäuse untersucht.

Tag 1 = Grundimmunisierung; Tag 20 = Tag 6 nach boost; Tag 28 = Tag 14 nach boost; Tag 34 = Tag 4 nach 2. boost.

↑ = Grundimmunisierung am Tag 0; ↑ = boost (=Reimmunisierung) an den Tagen 14 u. 30.

Bei den mit OVA-CFA-immunisierten Mäusen zeigte sich am Tag 12 ein 12facher Unterschied an IgE zwischen WT- und IgE-knock-in-Mäusen. Am Tag 20 (Tag 6 nach boost) fanden sich sogar 600fache Unterschiede. Hier war das Maximum der IgE-Antwort der knock-in-Mäuse erreicht. Am Tag 28 konnte ein 10facher

Titerunterschied nachgewiesen werden, bevor sich nach erneutem boost ein gut 300facher Unterschied einstellte.

Die knock-in-Mäuse produzierten nach der Reimmunisierung mit OVA deutlich mehr IgG_{2a} als WT-Mäuse mit im weiteren Verlauf stetig ansteigenden Titern. Am Tag 34 war bei den IgE-knock-in-Mäusen 6mal mehr IgG_{2a} zu messen als bei den Wildtypmäusen. Ein Unterschied dieser Größenordnung konnte auch an den anderen Tagen nachgewiesen werden.

Die IgG₁-Titer stiegen nach Reimmunisierung auf den 40fachen Wert vor boost an, WT- und IgE-knock-in-Mäuse ließen sich aber nicht unterscheiden. Die Titer waren im weiteren Verlauf des Experiments unverändert.

IgM-Titer verzeichneten nach jeder Reimmunisierung einen Anstieg, auch hier waren WT- und IgE-knock-in-Mäuse nicht unterscheidbar.

2.3.2. Immunisierung mit DNP-KLH und Aluminiumhydroxid (Alum)

Präparation von DNP-KLH für Grundimmunisierung (KLH als Proteinantigen und das daran gekoppelte DNP (Dinitrophenol)):

Alum (als Adjuvans) und DNP-KLH wurden im Verhältnis 2:1 1 h lang gemischt und abzentrifugiert. Das an Alum adsorbierte Ag wurde gewaschen und in PBS aufgelöst. Schließlich haben wir noch Bordetella pertussis-Antigen als weiteres Adjuvans hinzugegeben, so daß pro Maus 100 µg DNP-KLH an Alum und 200 ng Bordetella pertussis-Antigen in einem Volumen von 200 µl gespritzt werden konnte. Diese 200 µl wurden zur einen Hälfte s. c. und zur anderen i. p. verabreicht.

Die Reimmunisierungen fanden ohne Zugabe von Bordetella pertussis-Antigen statt.

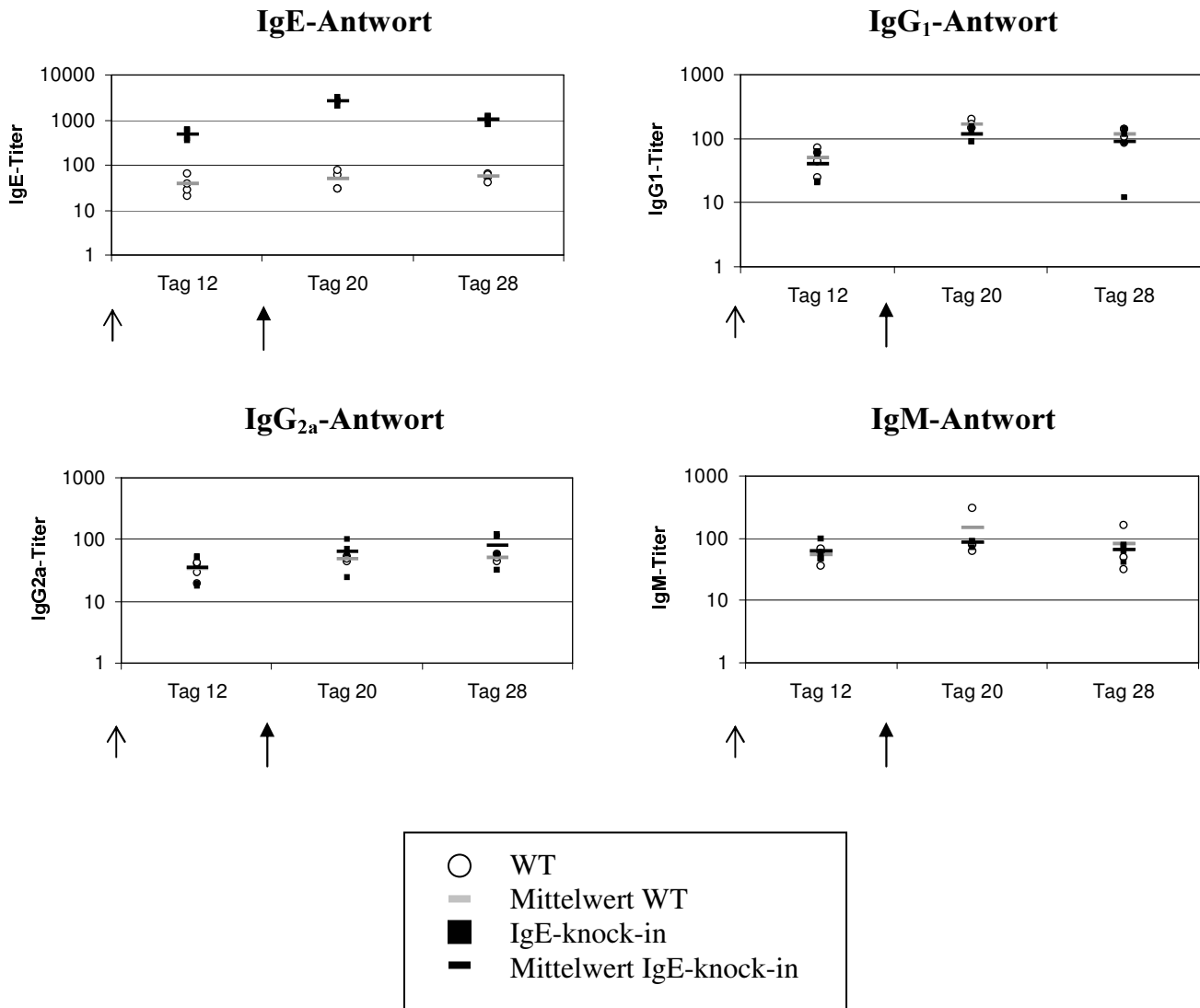


Abb. 25: Gezeigt ist die Immunisierung mit je 100 μ g DNP-KLH pro Maus und Alum bzw. Bordetella pertussis-Ag als Adjuvantien. Pro Gruppe wurden 4 Mäuse untersucht.

Tag 1 = Grundimmunisierung; Tag 20 = Tag 6 nach boost; Tag 28 = Tag 14 nach boost

↑ = Grundimmunisierung am Tag 0; ↑ = boost (=Reimmunisierung) am Tag 14

Die IgE-Antwort der mit DNP-KLH an Alum mit Bordetella pertussis als Adjuvans immunisierten IgE-knock-in-Mäuse glich der Kinetik der mit OVA immunisierten knock-in-Mäuse mit einem Maximum der IgE-Produktion am Tag 20 (Tag 6 nach boost). Hier zeigt sich ein 32facher Unterschied in der IgE-Produktion zur WT-Maus. Am Tag 28 konnte ein Absinken der IgE-Titer beobachtet werden, wobei sich ein 20facher Unterschied einstellte.

Die Unterschiede der IgG_{2a}-Titer zwischen WT- und IgE-knock-in-Mäusen in der DNP-KLH Gruppe waren deutlich geringer ausgeprägt als in der OVA-Gruppe. Der maximale Unterschied zwischen WT- und IgE-knock-in-Mäusen betrug 30 %. Es zeigte sich ein Anstieg der Titer bis Tag 28.

IgG₁ stieg nach dem boost mit DNP-KLH an Alum auf den 3fachen Wert von IgG₁ vor Reimmunisierung. WT- und IgE-knock-in-Mäuse waren aber nicht wesentlich unterscheidbar. Am Tag 28 waren annähernd gleiche IgG₁-Titer nachzuweisen.

Bei den IgM-Titern war ein Anstieg der Titer nach der Reimmunisierung zu erkennen, aber auch hier waren WT- und IgE-knock-in-Mäuse nicht wesentlich differenzierbar.

Vor der Immunisierung fanden sich sowohl bei mit OVA-CFA wie bei mit DNP-KLH/ Alum immunisierten Mäusen keine spezifischen AK gegen das jeweilige Ag (nicht gezeigt).

2.4. Anaphylaxie bei IgE-knock-in-Mäusen

In Immunisierungsexperimenten konnte eine deutlich gesteigerte IgE-Produktion in IgE-knock-in-Mäusen nachgewiesen werden. Um zu testen, ob dies auch Ausdruck in einem pathophysiologischen Effekt findet, wurde versucht, bei immunisierten Mäusen entweder eine aktive kutane Anaphylaxie (ACA) oder eine systemische Anaphylaxie zu provozieren.

2.4.1. Aktive kutane Anaphylaxie (ACA) in IgE-knock-in-Mäusen

Nach erneuter Antigenexposition, gegen das die Mäuse bereits nach den Immunisierungen spezifisches IgE produziert haben, kommt es zur Kreuzvernetzung des Antigen-IgE-Rezeptor-Komplexes, was zur Degranulation von Mastzellen führt. Durch die freigesetzten vasoaktiven Stoffe (z. B. Histamin) werden die Kapillaren durchlässiger. Der aufgrund seiner hohen Molmasse (MM 961) normalerweise in den Gefäßen zurückgehaltene Farbstoff Evans-Blau tritt an den Stellen, wo eine Mastzell-

Degranulation stattgefunden hat, aus der Blutbahn aus. Dies führt in der Haut zu makroskopisch sichtbaren „blauen Flecken“.

Mit 100 µg DNP-KLH/Alum immunisierte Mäuse wurden am Tag 14 mit 100 µg DNP-KLH/Alum reimmunisiert und am Tag 21 für dieses Experiment verwendet.

Zur Erleichterung der intradermalen Injektion des Antigens wurden die Haare am Bauch abrasiert und den Mäusen intradermal verschiedene Mengen an DNP-KLH (0 ng, 50 ng oder 500 ng) in 50 µl PBS, 0,1 % (w/v) BSA und anschließend 200 µl einer 0,5 % Evans-Blau-Lösung in PBS, 0,1 % (w/v) BSA systemisch in die Schwanzvene injiziert. Die Mäuse wurden 20 min später getötet. Danach hat man das Fell abgezogen und daraufhin untersucht, ob an den Injektionsstellen Evans-Blau in das Gewebe ausgetreten war (Adamczewski et al., 1991).

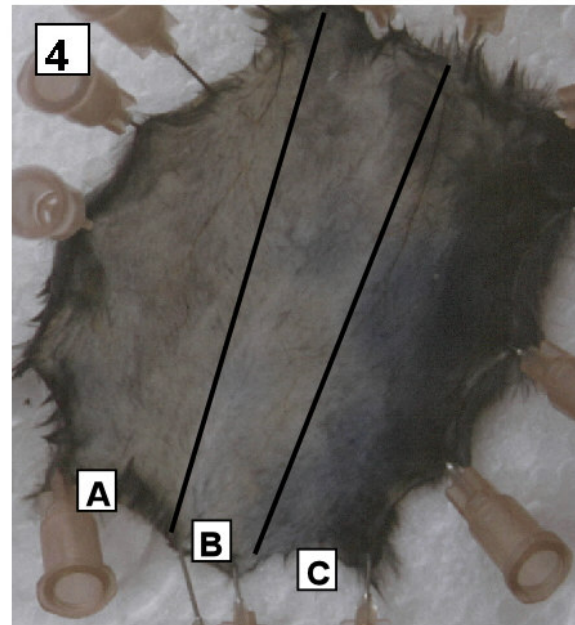
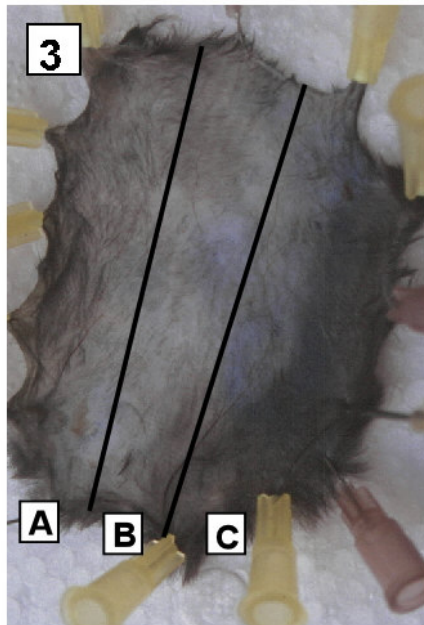
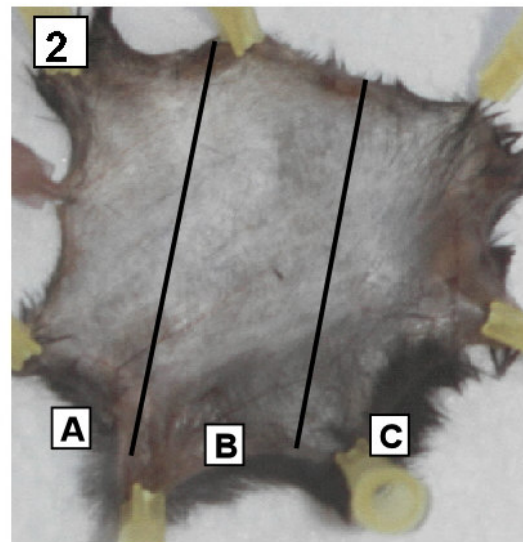
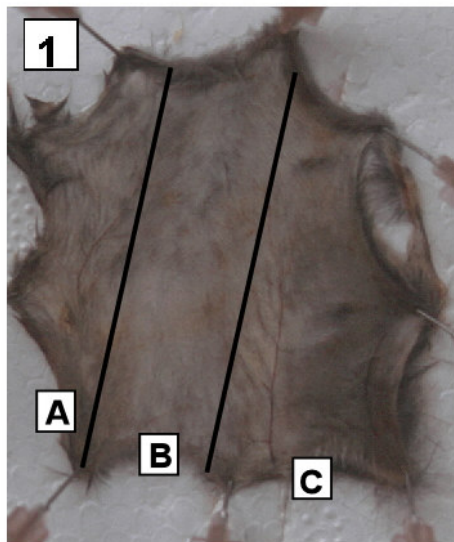


Abb. 26: Hier werden die Aufnahmen von Mäusen gezeigt, bei denen aktive kutane Anaphylaxie ausgelöst wurde. Es wurden von links nach rechts zunehmende Konzentrationen von Ag injiziert. A = 0 ng; B = 50 ng; C = 500 ng
 Bild Nr. 1 zeigt das Fell einer unimmunisierten Wildtypmaus, Bild Nr. 2 einer nicht immunisierten IgE-knock-in-Maus. Bei diesen beiden Abbildungen ist kein Farbstoffaustritt zu verzeichnen.
 Bild Nr. 3 zeigt das Fell einer immunisierten Wildtypmaus. Auf Bild Nr. 4 sieht man das Fell einer immunisierten IgE-knock-in-Maus. Bei den Bildern 3 und 4 erkennt man in Abhängigkeit der Ag-Konzentration eine Größenzunahme des Farbstoffaustrittes.

Bei nicht immunisierten WT- (Abb. 26, Nr. 1) und IgE-knock-in-Mäusen (Abb. 26, Nr. 2) war kein Austritt von Farbstoff zu verzeichnen.

Bei immunisierten Mäusen zeigte sich in den Regionen, wo kein Antigen injiziert worden war, nur sehr schwache oder keine Blaufärbung. Dort, wo Antigen gespritzt wurde, zeigten sich in Abhängigkeit von der Konzentration des Antigens verschieden große „blaue Flecken“ - entstanden durch Austritt von Evans-Blau.

Die Hautreaktionen von WT- (Abb. 26, Nr. 3) und IgE-knock-in-Mäusen (Abb. 26, Nr. 4) waren nicht unterscheidbar.

2.4.2. Systemische Anaphylaxie

Eine für systemische Anaphylaxie typische und leicht zu messende Veränderung bei Mäusen ist der Abfall der Körpertemperatur (Matsuoka et al., 1999).

Weiters kann man bei Mäusen, die eine systemische Anaphylaxie erleiden, nach i.v. Injektion von Antigen und Farbstoff (Evans-Blau) einen ubiquitären Austritt von Farbstoff aus den Gefäßen beobachten. Dies wird makroskopisch durch eine Blauverfärbung der Maus deutlich.

Um die Körpertemperatur rektal hinreichend genau messen zu können, verwendeten wir für diese Experimente ein elektronisches Thermometer mit Drahtfühler mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Die systemische Anaphylaxie wurde mit 500 μg Antigen / Maus in 200 μl 0,5 %-iger Evans-Blau-Lösung ausgelöst.

Nicht immunisierte Mäuse, sowohl WT- als auch IgE-knock-in-Mäuse, zeigten keinerlei Änderung der Körpertemperatur (mit Ausnahme des Verdünnungseffektes durch kühle Antigenlösung) und auch keine Blauverfärbung.

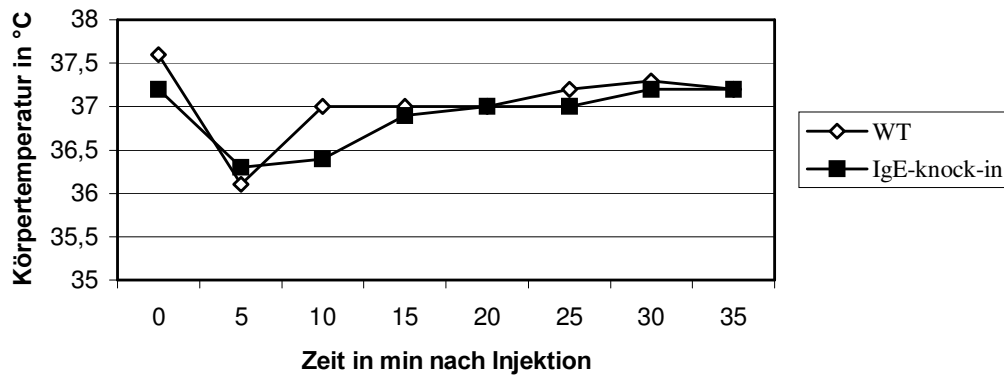


Abb. 27: Dargestellt ist der Körpertemperaturverlauf einer unimmunisierter WT- und IgE-knock-in-Maus nach i.v. Injektion von 500 µg OVA

Um die Dynamik der Mastzellsensibilisierung in-vivo zu untersuchen, wurden verschiedene Immunisierungsprotokolle verwendet.

A. Einmalige Immunisierung mit 3 µg Antigen

Einmal mit niedriger Antigendosis immunisierte Mäuse (3 µg OVA/Alum i.p. und s.c. 14 Tage vor dem Experiment) zeigten keinen für systemische Anaphylaxie typischen Verlauf der Körpertemperatur nach Injektion von 500 µg OVA.

Bei der IgE-knock-in-Maus war nach fünf Minuten eine deutlich niedrigere Körpertemperatur zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf des Experimentes lag die Körpertemperatur der IgE-knock-in-Maus um gut 0,5°C unter der der WT-Maus.

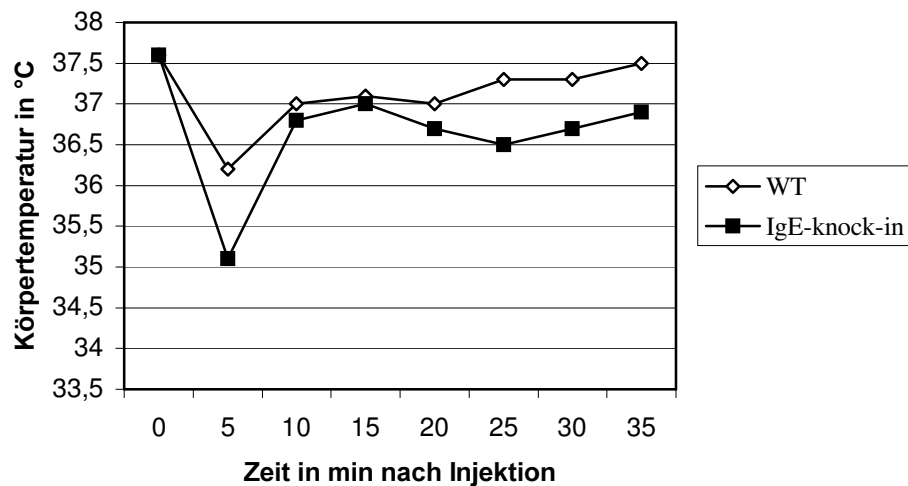


Abb. 28: Gezeigt wird der Verlauf der Körpertemperatur von mit 3 μg OVA/Alum immunisierten Mäusen nach Injektion von 500 μg OVA i.v.

B. Zweimalige Immunisierung mit 100 μg Antigen und „Challenge“ 7 Tage nach letzter Immunisierung

Bei zweimal mit 100 μg OVA und Freund'schen-Adjuvans immunisierten Mäusen mit der letzten Reimmunisierung sieben Tage vor der Injektion von 500 μg OVA war ein rascher Temperaturabfall zu verzeichnen, der mit dem Tod der Mäuse endete.

Hier war der Abfall der Körpertemperatur von WT- und IgE-knock-in-Mäusen nicht zu unterscheiden, die IgE-knock-in-Maus lebte 20 min länger.

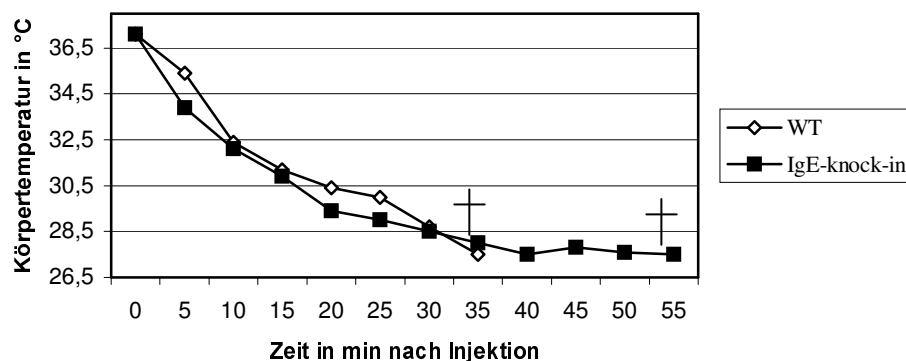


Abb. 29: Dargestellt ist der Abfall der Körpertemperatur bei zweimalig mit 100 μg OVA und Freund'schen-Adjuvans immunisierten Mäusen mit letztmaliger Reimmunisierung sieben Tage vor dem Experiment. Nach Injektion von 500 μg OVA i.v. kam es zu einem letalen Abfall der Körpertemperatur.

- C. Zweimalige Immunisierung mit 100 µg Antigen und „Challenge“ 7 Tage nach letzter Immunisierung mit halber Ag-Menge

Nach Reduktion der Ag-Dosis, mit der die systemische Anaphylaxie ausgelöst werden sollte auf 250 µg OVA/Maus, fand man - bei zum Vorexperiment sonst unveränderten Bedingungen - ebenfalls einen raschen, jedoch nicht so drastischen Temperaturabfall. Hier überlebten sowohl WT- als auch IgE-knock-in-Mäuse.

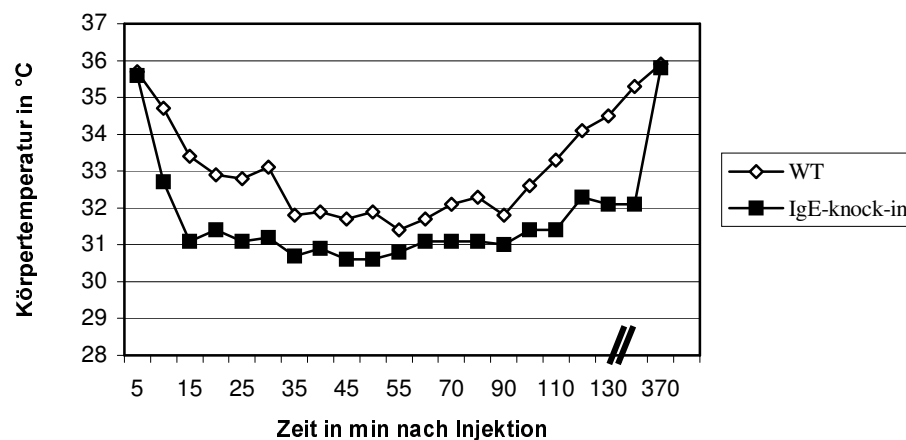


Abb. 30: Dargestellt ist der Abfall der Körpertemperatur bei zweimalig mit 100 µg OVA und Freund'schen-Adjuvans immunisierten Mäusen mit letztmaliger Reimmunisierung sieben Tage vor dem Experiment. Die systemische Anaphylaxie wurde mit halber Ag-Dosis (250 µg OVA i.v.) ausgelöst.

- D. Zweimalige Immunisierung mit 100 µg DNP-KLH an Alum und „Challenge“ 14 Tage nach letzter Immunisierung

Nach Immunisierung mit 100 µg DNP-KLH/Alum i.p. und s.c. und Reimmunisierung am Tag 14 wurden die Mäuse am Tag 28 für das Experiment verwendet.

Es wurden 500 µg DNP-KLH i.v. injiziert.

Bei den IgE-knock-in-Mäusen zeigte sich ein rascher und dramatischer Temperaturabfall. Die Mäuse überlebten aber. Bei den WT-Mäusen war nur ein leichter Temperaturabfall zu verzeichnen.

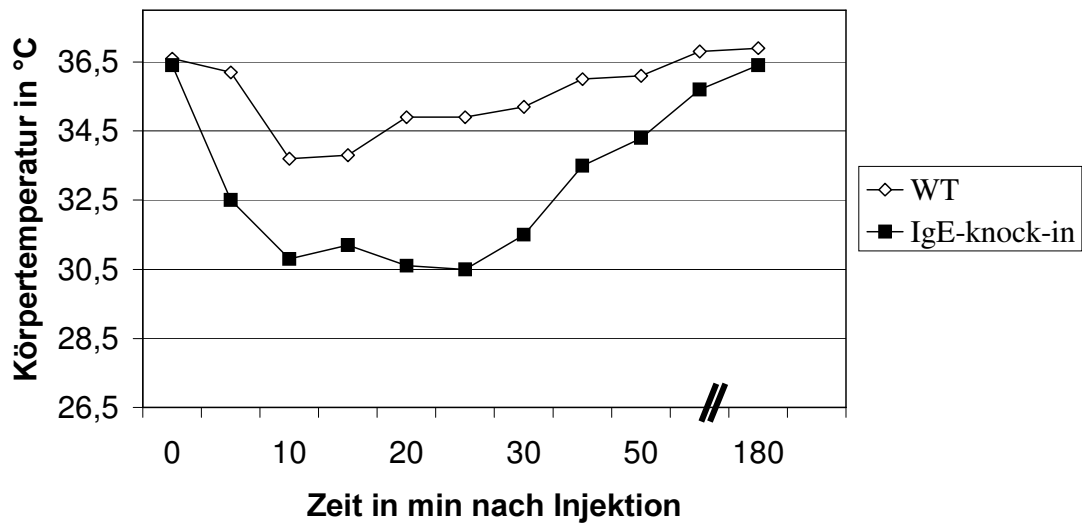


Abb. 31: Verlauf der Körpertemperatur nach Injektion von 500 μg DNP-KLH i.v. bei mit 100 μg DNP-KLH immunisierten Mäusen am Tag 28, nachdem sie am Tag 14 die erste Reimmunisierung erhielten.

2.5. Analyse des Zytokinprofils von Milzzellen

Wie schon in der Einleitung zu dieser Arbeit erwähnt, ermöglichte die Identifikation zweier T-Helferzell-Subpopulationen mit ihrem unterschiedlichen Zytokinexpressionsmuster Einblicke in die molekulare Regulation von Immunantworten (Mosmann et al., 1986; Mosmann et al., 1989).

Mit die wichtigste Rolle bei der Regulation von allergischen Reaktionen scheinen IFN- γ und IL-4 zu spielen (vgl. Einleitung zu dieser Arbeit). So interessiert u.a., ob sich WT- und IgE-knock-in-Mäuse in ihrer Expression von IL-4 und IFN- γ unterscheiden, was zu der Fragestellung führt, ob ein erhöhter IgE-Serumspiegel die Ausdifferenzierung zu den verschiedenen T-Helferzell-Subpopulationen beeinflussen kann.

2.5.1. Analyse des Zytokinprofils von Milzzellen mittels QPCR

Ein Problem bei der Bestimmung von Zytokinen ist die Quantifizierung. Zytokine liegen in geringsten Konzentrationen vor und sind im Blutserum oft nicht nachweisbar, denn ihre Wirkung wird durch eine extrem kurze Halbwertszeit lokal begrenzt. Diese Mediatoren werden deshalb meist auf der Ebene ihrer Expression als mRNA gemessen.

Für die folgenden Experimente wurden je Gruppe 2 Mäuse verwendet. Diese Mäuse unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

2.5.1.1. Bestimmung von IFN- γ

In CD4⁺-Milzzellen von WT- und IgE-knock-in-Mäusen wurde konstant viermal mehr IFN- γ -mRNA synthetisiert als in nicht CD4⁺-Zellen. Nach Immunisierung mit DNP-KLH an Alum konnte man bei IgE-knock-in-Mäusen eine Induktion von IFN- γ um den Faktor vier im Vergleich zu nicht immunisierten Mäusen nachweisen. Dieses Verhältnis spiegelte sich auch in WT-Mäusen wider.

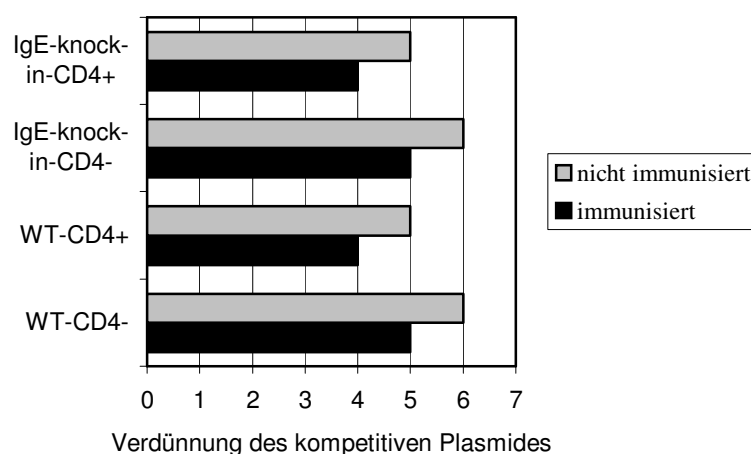


Abb. 32: Grafische Darstellung der IFN- γ -RNA-Expression in den verschiedenen Zellpopulationen mit quantitativer RT-PCR (zum Prinzip der quantitativen RT-PCR vgl. Material und Methoden 2.2.4). Schematisch sind die Äquivalenzpunkte (entsprechend der Verdünnung des kompetitiven Plasmides) der verschiedenen PCR-Experimente angegeben.

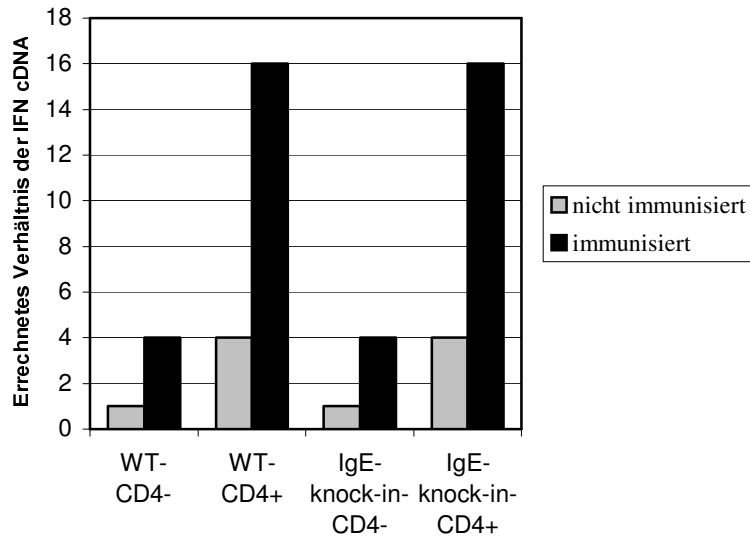


Abb. 33: Anhand der Äquivalenzpunkte wurde das Verhältnis der IFN- γ -cDNA in den verschiedenen Zellpopulationen errechnet. Der Berechnung liegt die vierfache serielle Verdünnung des kompetitiven Plasmides (vgl. Material und Methoden 2.2.4) zu Grunde. Verdünnung 6 des kompetitiven Plasmides wurde mit 1 festgesetzt.

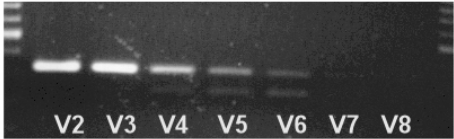
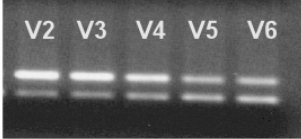
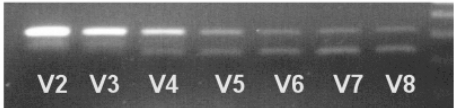
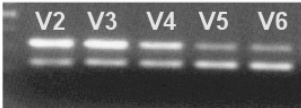
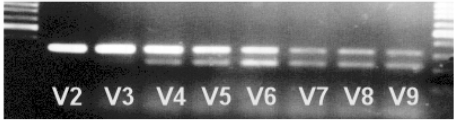
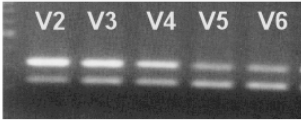
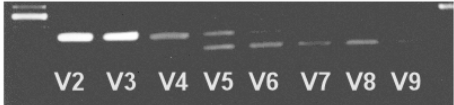
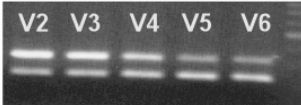
| | | nicht immunisiert | Äquivalenz- punkt b. Verdünnung | immunisiert | Äquivalenz- punkt b. Verdünnung |
|-----------------|------|--|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| WT | CD4- |  | 6 |  | 5 |
| | CD4+ |  | 5 |  | 4 |
| IgE knock in | CD4- |  | 6 |  | 5 |
| | CD4+ |  | 5 |  | 4 |

Abb. 34: Repräsentative Ausschnitte aus $IFN-\gamma$ QPCR Experimenten der unterschiedlichen Zellpopulationen mit Bestimmung und Angabe der Äquivalenzpunkte (entsprechend der Verdünnung des kompetitiven Plasmides).

2.5.1.2. Bestimmung von IL-4

In nicht immunisierten WT- und IgE-knock-in-Mäusen konnte man in CD4⁻-Zellen keine IL-4-mRNA bzw. -cDNA nachweisen. Bei CD4⁺-Zellen konnte kaum IL-4 nachgewiesen werden, da der Äquivalenzpunkt bei Verdünnung Nr. 9 des Plasmides noch nicht erreicht war.

Bei immunisierten Mäusen konnte man eine starke Induktion von IL-4-mRNA nachweisen. So lag der Äquivalenzpunkt bei CD4⁺-Zellen von immunisierten WT-Mäusen bei Verdünnung 4 des kompetitiven Plasmides, bei CD4⁻-Zellen zwischen 4 und 5. In IgE-knock-in-CD4⁺-Zellen konnte man den Äquivalenzpunkt zwischen Verdünnung 4 und 5, in CD4⁻-Zellen bei Verdünnung 5 ausmachen. Somit wurde in CD4⁺-Zellen doppelt so viel IL-4 synthetisiert wie in CD4⁻-Zellen.

In immunisierten IgE-knock-in-Mäusen lag der Äquivalenzpunkt der CD4⁺-Zellen zwischen 4 und 5. Von den IgE-knock-in-Mäusen wurde halb so viel IL-4 synthetisiert wie von den WT-Mäusen.

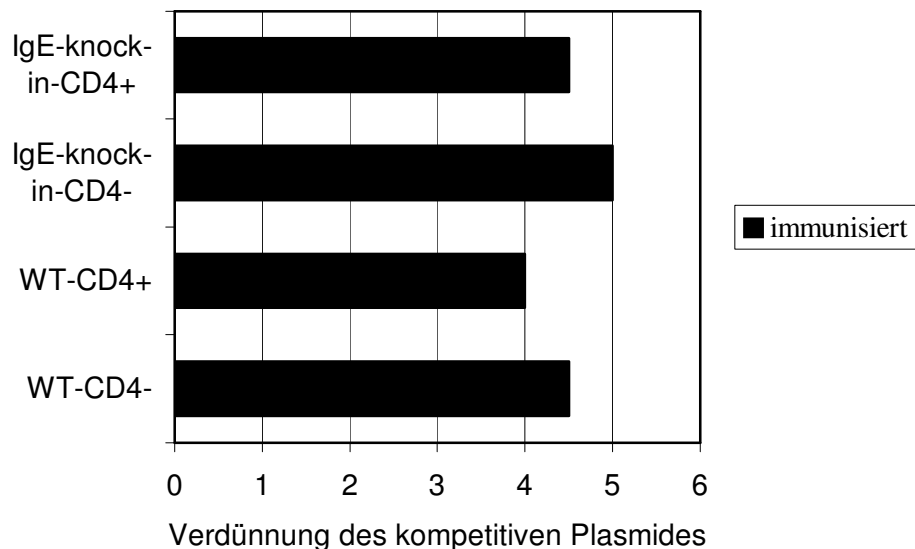


Abb. 35: Grafische Darstellung der IL-4-RNA-Expression von immunisierten Mäusen in den verschiedenen Zellpopulationen mit quantitativer RT-PCR. Schematisch sind die Äquivalenzpunkte der verschiedenen QPCR-Experimente angegeben. Bei nicht immunisierten Mäusen konnte keine IL-4-cDNA nachgewiesen werden.

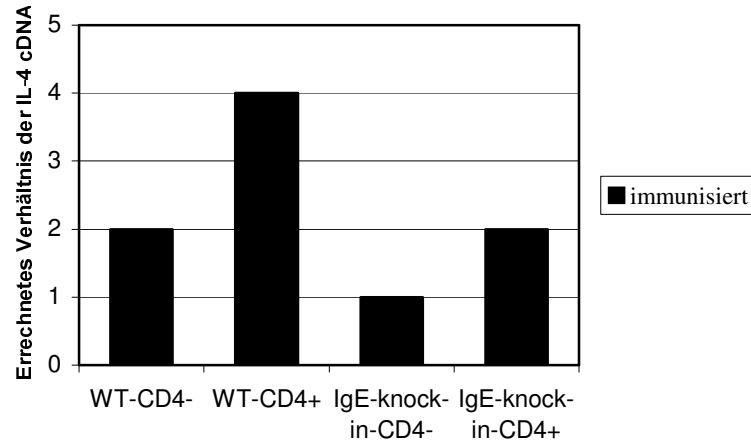


Abb. 36: Anhand der Äquivalenzpunkte wurde das Verhältnis der IL-4-cDNA von immunisierten Mäusen in den verschiedenen Zellpopulationen errechnet. Der Berechnung liegt die vierfache serielle Verdünnung des kompetitiven Plasmides (vgl. Material und Methoden 2.2.4) zu Grunde. Verdünnung 5 des kompetitiven Plasmides wurde mit 1 festgesetzt. Bei nicht immunisierten Mäusen konnte keine bzw. nur sehr wenig IL-4-cDNA nachgewiesen werden.

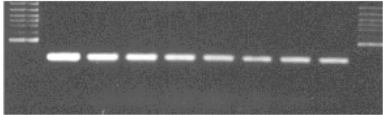
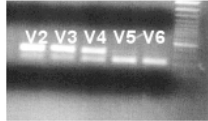
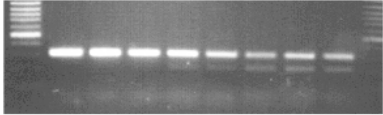
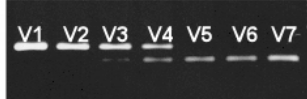
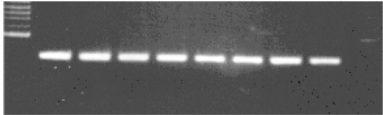
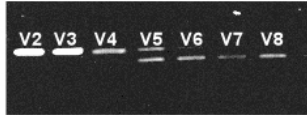
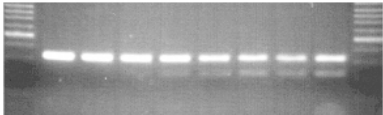
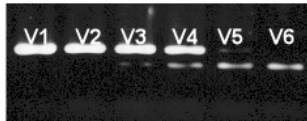
| | | nicht immunisiert | | immunisiert | |
|-----------------|------|--|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| | | | Äquivalenz- punkt b. Verdünnung | | Äquivalenz- punkt b. Verdünnung |
| WT | CD4- |  | nicht nachweisbar |  | 4-5 |
| | CD4+ |  | < 9 |  | 4 |
| IgE knock in | CD4- |  | nicht nachweisbar |  | 5 |
| | CD4+ |  | < 9 |  | 4-5 |

Abb. 37: Repräsentative Ausschnitte aus IL-4-QPCR-Experimenten der unterschiedlichen Zellpopulationen mit Bestimmung und Angabe der Äquivalenzpunkte.

2.5.2. Analyse des Zytokinprofiles von Milzzellen mittels intrazellulärem FACS

Ein im Vergleich zur quantitativen PCR weitaus sensitiveres Verfahren, Zytokinexpression zu untersuchen, ist die intrazelluläre FACS-Analyse.

Die Anfärbung von intrazellulären Zytokinen setzt monoklonale Antikörper gegen das zu untersuchende Zytokin voraus. Diese Antikörper dürfen aber durch die Fixation und das „Durchlöchern“ der Zellmembran nicht zerstört werden.

Optimales intrazelluläres Anfärben von Zytokinen wurde durch Fixation mit Formaldehyd und anschließender Behandlung mit dem Detergenz Saponin (Sigma) erzielt. Die Fixation mit Formaldehyd bewirkt eine Stabilität der Zellmorphologie und ihrer intrazellulären Antigenität. Die Behandlung der Zellen mit Saponin erlaubt den zytokinspezifischen monoklonalen Antikörpern das Durchdringen der Zellmembran, des Zytosols und der Membranen von Endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat (Jung et al., 1993; Prussin et al., 1995).

Wir stimulierten 1×10^7 Milzzellen von mit DNP-KLH immunisierten Mäusen in 5 ml Medium entweder mit Hamster-anti-CD3- ϵ (1 $\mu\text{g/ml}$), welcher durch einen Zweitantikörper (Ziege-anti-Hamster IgG) 0,5 $\mu\text{g/ml}$ kreuzvernetzt wurde oder mit Antigen (KLH, 50 $\mu\text{g/ml}$). Nach 20 h erfolgte die Zugabe von Breveldin A 5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma). Breveldin A blockiert den Golgi-Apparat, was zur Anreicherung der Zytokine in der einzelnen Zelle führt (Jung et al., 1993). Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Nun erfolgte die Oberflächenfärbung nach CD4 und CD8, wie bereits bei Material und Methoden (2.8.) erläutert. Nach erneutem Waschen und Resuspendieren des Pellets in 2 ml PBS wurden 2 ml 5 %-iges Formaldehyd hinzugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach Waschen mit PBS haben wir zu einem Teil der Zellen den AK gegen IFN- γ und zum anderen Teil den AK gegen IL-4 hinzugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Diese AK gegen Zytokine wurden in Saponinpuffer verdünnt (0,5 % Saponin in PBS; 0,05 % BSA; 0,05 % Azid). Nach Waschen mit Saponinpuffer erfolgte die Resuspension in FACS-Puffer und Analyse auf dem FACS-Calibur.

2.5.2.1. Färbung mit anti-IFN- γ

A. IFN- γ^+ /CD4 $^+$ -Milzzellen

Nach Stimulation der Milzzellen mit KLH fanden wir in CD4 $^+$ -IgE-knock-in-Milzzellen 0,39 % IFN- γ -positive Zellen, in CD4 $^+$ -WT-Milzzellen waren 0,48 % für IFN- γ positiv.

Inkubation mit anti-CD3- ϵ führte bei 0,44 % der CD4 $^+$ -IgE-knock-in-Milzzellen zu IFN- γ -positiven Zellen, bei CD4 $^+$ -WT-Milzzellen fanden sich 0,77 % mit anti-IFN- γ anfärbbare Zellen.

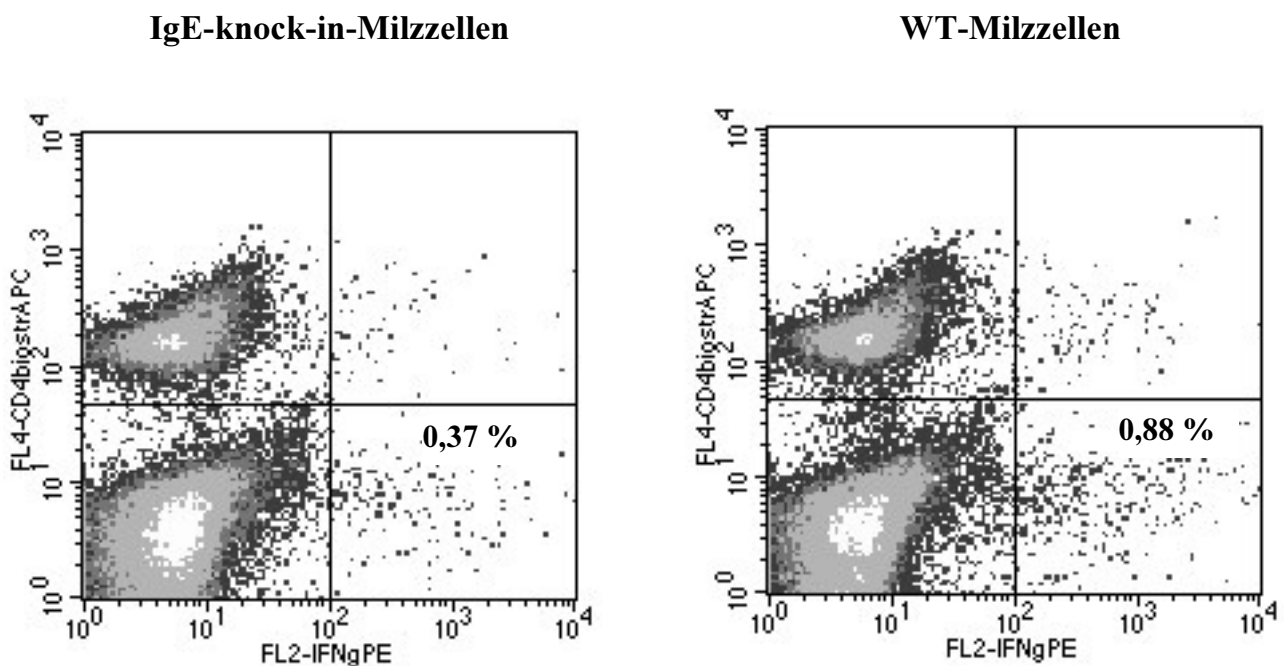


Abb. 38: Darstellung einer IFN- γ /CD4-Färbung von Milzzellen nach *in vitro*-Stimulation mit anti-CD3- ϵ . Angegeben sind die IFN- γ^+ - unter den CD4 $^+$ -Milzzellen. Links eine IgE-knock-in-Maus (Nr. 195), rechts eine WT-Maus (Nr. 193).

Tab. 1: Prozentuale Anteile der $\text{IFN-}\gamma^+$ an CD4^+ -Milzzellen. Angegeben sind die Werte von je drei WT- und IgE-knock-in-Mäusen mit den verschiedenen Stimulationen (KLH oder anti-CD3) sowie die Durchschnittswerte.

| WT | KLH | anti-CD3 | IgE-knock-in | KLH | anti-CD3 |
|--------------|--------|----------|--------------|--------|----------|
| Maus 193 | 0,44 % | 0,88 % | Maus 194 | 0,32 % | 0,77 % |
| Maus 201 | 0,61 % | 0,86 % | Maus 195 | 0,27 % | 0,37 % |
| Maus 203 | 0,39 % | 0,55 % | Maus 199 | 0,57 % | 0,18 % |
| Durchschnitt | 0,48 % | 0,77 % | Durchschnitt | 0,39 % | 0,44 % |

B. $\text{IFN-}\gamma^+/\text{CD4}^+$ -Milzzellen

Nach Stimulation mit Antigen (DNP-KLH) waren 3,91 % der CD4^+ -WT-Milzzellen $\text{IFN-}\gamma$ -positiv. Bei den CD4^+ -IgE-knock-in-Milzzellen fanden sich 2,81 % $\text{IFN-}\gamma$ -positive Zellen.

Von anti-CD3- ϵ stimulierten CD4^+ -WT-Milzzellen reagierten durchschnittlich 5,33 % auf anti- $\text{IFN-}\gamma$ positiv. Bei den CD4^+ -IgE-knock-in-Milzzellen war dies in 3,79 % der Fall.

Für beide Stimulationsarten konnten somit in CD4^+ -WT-Milzzellen 40 % mehr $\text{IFN-}\gamma$ -positive Zellen nachgewiesen werden.

Im Folgenden sind die FACS-Analysedaten für die Stimulation der CD4^+ -Zellen mit anti-CD3- ϵ aufgezeigt.

CD4⁺-WT-Milzzellen

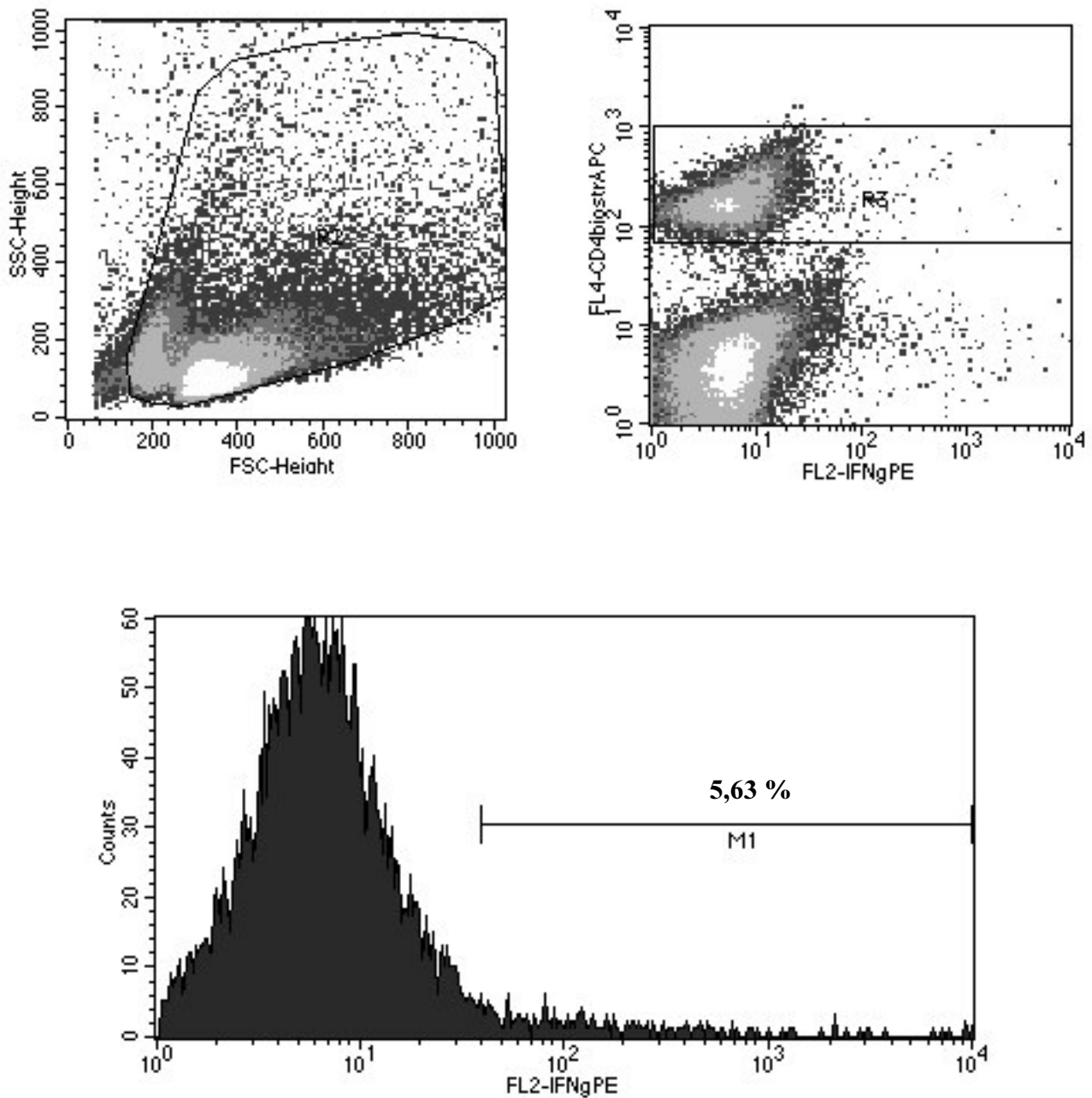


Abb. 39: Mit anti-CD3- ϵ stimulierte CD4⁺-WT-Milzzellen (Maus 203). Oben links wird der Forward-Side-Scatter mit dem Gate, der die Zellen in die Analyse einschließt, gezeigt. Oben rechts ist die IFN- γ -Färbung gegen die CD4-Färbung dargestellt. Unten werden die CD4⁺-Zellen (R3) in einem Histogramm gegen die IFN- γ -Färbung aufgetragen. M1 signalisiert die IFN- γ -positiven Zellen.

CD4⁺-IgE-knock-in-Milzzellen

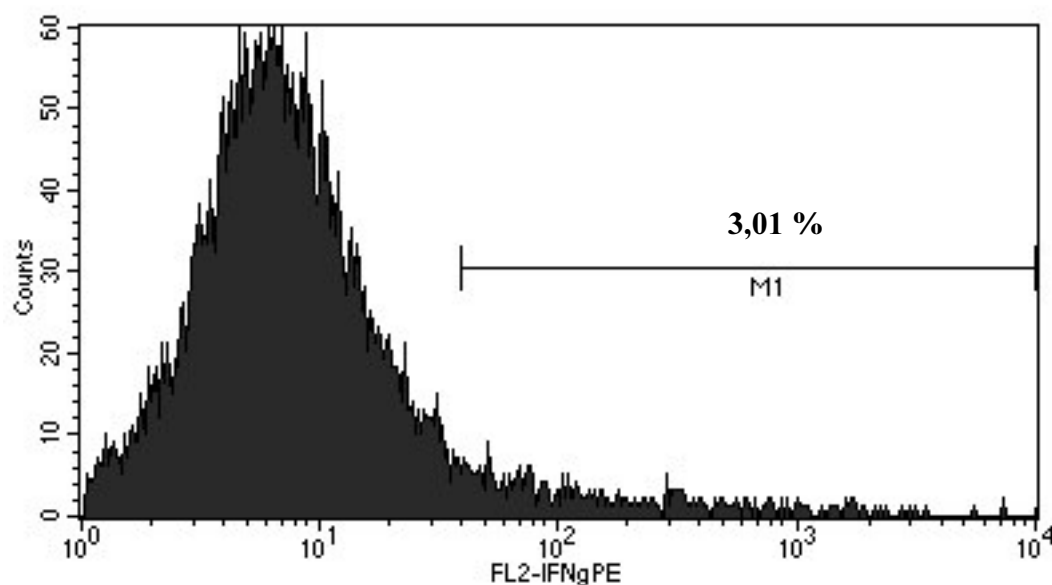


Abb. 40: Dargestellt wird ein Histogramm, in dem die CD4⁺-Zellen der IgE-knock-in-Milzzellen (Maus Nr. 195) gegen die IFN- γ Färbung aufgetragen wurden. M1 signalisiert die IFN- γ positiven Zellen. Die „Gates“ wurden im Vergleich zum Vorexperiment (vgl. Abb. 39) unverändert übernommen, so daß auf die erneute Darstellung der „Gates“ verzichtet wurde.

Tab. 2: Prozentuale Anteile der IFN- γ ⁺- an CD4⁺-Milzzellen. Angegeben sind die Werte von je drei WT- und IgE-knock-in-Mäusen mit den verschiedenen Stimulationen (KLH oder anti-CD3) sowie die Durchschnittswerte.

| WT | KLH | anti-CD3 | IgE-knock-in | KLH | anti-CD3 |
|--------------|--------|----------|--------------|--------|----------|
| Maus 193 | 4,33 % | 5,47 % | Maus 194 | 2,23 % | 4,26 % |
| Maus 201 | 3,01 % | 4,91 % | Maus 195 | 3,47 % | 3,01 % |
| Maus 203 | 4,40 % | 5,63 % | Maus 199 | 2,73 % | 4,09 % |
| Durchschnitt | 3,91 % | 5,33 % | Durchschnitt | 2,81 % | 3,79 % |

2.5.2.2. Färbung mit anti-IL-4

A. IL-4⁺/CD4⁻-Milzzellen

Nach Stimulation der Milzzellen mit KLH fand man unter den CD4⁻-IgE-knock-in-Milzzellen 0,39 %, die sich mit anti-IL-4 anfärben ließen. Bei den WT-Milzzellen waren 0,49 % für IL-4 positiv.

Anti-CD3-ε-Stimulation führte zu 0,26 % IL-4-positiven-CD4⁻-Zellen der IgE-knock-in-Milzzellen, während 0,53 % der WT-Milzzellen für IL-4 positiv waren.

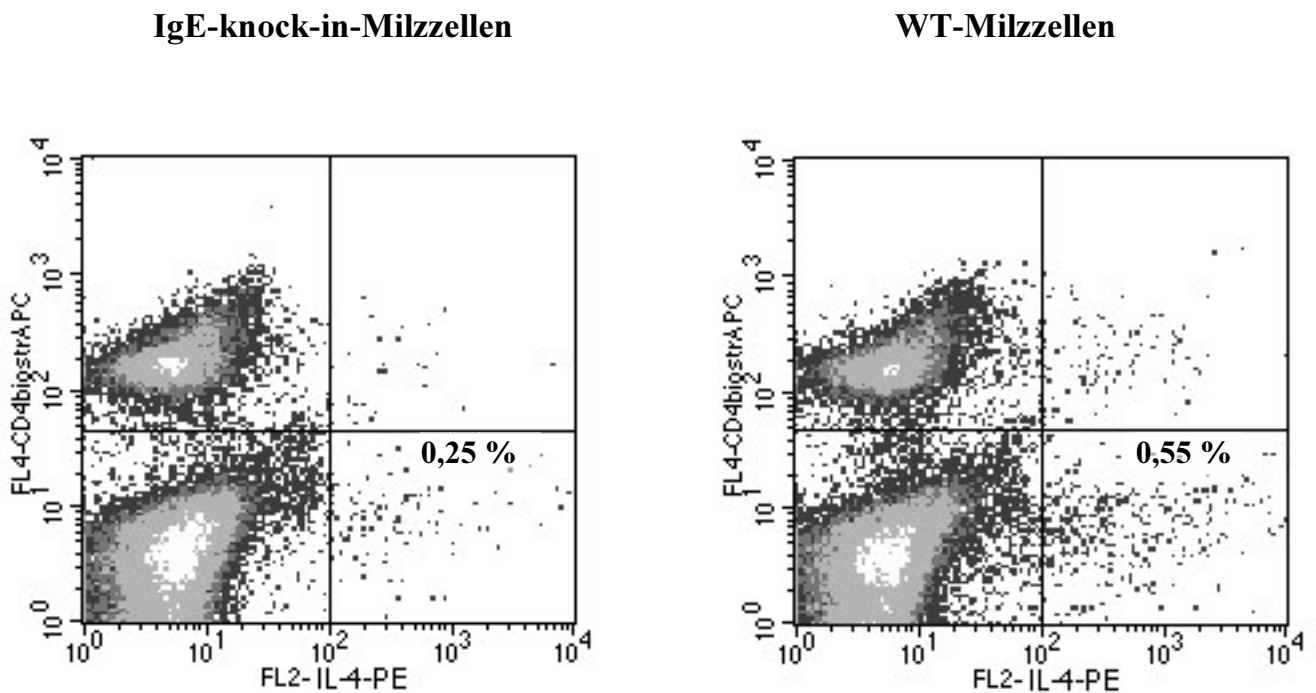


Abb. 41: Darstellung einer IL-4/CD4-Färbung von Milzzellen nach Stimulation mit anti-CD3-ε. Angegeben sind die IL-4⁺- unter den CD4⁻-Zellen. Links eine IgE-knock-in-Maus (Nr. 195), rechts eine WT-Maus (Nr. 201).

Tab. 3: Prozentuale Anteile der IL-4⁺ - an CD4⁺-Milzzellen. Angegeben sind die Werte von je drei WT- und IgE-knock-in-Mäusen mit den verschiedenen Stimulationen (KLH oder anti-CD3) sowie die Durchschnittswerte.

| WT | KLH | anti-CD3 | IgE-knock-in | KLH | anti-CD3 |
|--------------|--------|----------|--------------|--------|----------|
| Maus 193 | 0,42 % | 0,68 % | Maus 194 | 0,33 % | 0,39 % |
| Maus 201 | 0,68 % | 0,55 % | Maus 195 | 0,16 % | 0,25 % |
| Maus 203 | 0,37 % | 0,37 % | Maus 199 | 0,55 % | 0,15 % |
| Durchschnitt | 0,49 % | 0,53 % | Durchschnitt | 0,35 % | 0,26 % |

B. IL-4⁺/CD4⁺-Milzzellen

Die Stimulation mit Antigen (DNP-KLH) erbrachte in den CD4⁺-WT-Milzzellen 3,24 % IL-4-positive Zellen. Bei CD4⁺-IgE-knock-in-Milzzellen ließen sich 2,64 % mit anti-IL-4 anfärben. Somit waren in den CD4⁺-WT-Milzzellen 23 % mehr IL-4-produzierende Zellen.

Bei mit anti-CD3-ε aktivierten CD4⁺-WT-Milzzellen waren 4,22 % für IL-4 positiv. Unter den mit anti-CD3-ε stimulierten CD4⁺-IgE-knock-in-Milzzellen fanden sich 3,32 %. Dies bedeutet eine 27 %-ige Erhöhung der IL-4-positiven Zellen in den CD4⁺-WT-Milzzellen.

CD4⁺-WT-Milzzellen

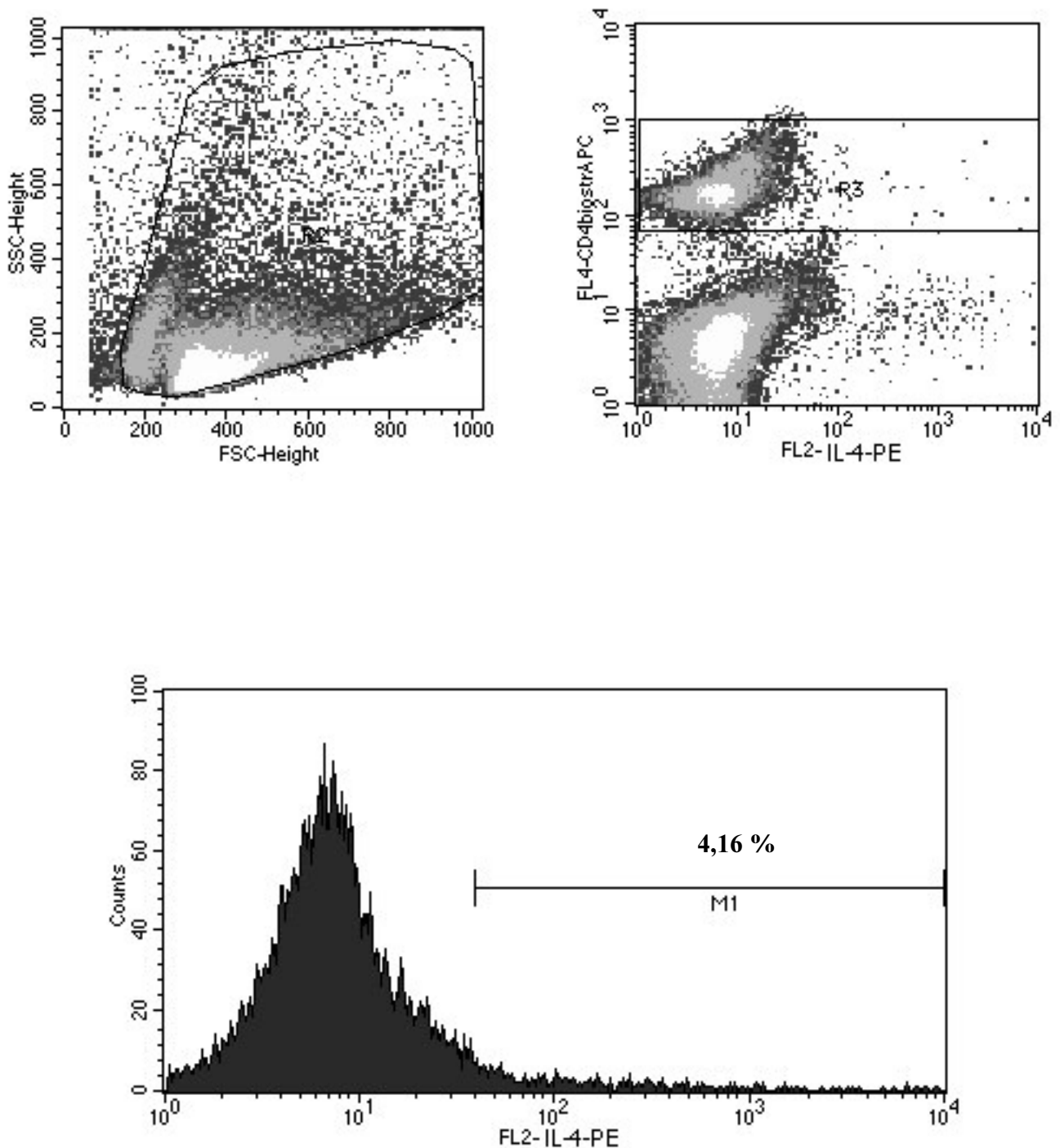


Abb. 42: Mit anti-CD3- ϵ stimulierte CD4⁺-WT-Milzzellen (Maus 201). Oben links wird der Forward-Side-Scatter mit dem Gate, der die Zellen in die Analyse einschließt, gezeigt. Oben rechts ist die IL-4-Färbung gegen die CD4-Färbung dargestellt. Unten werden die CD4⁺-Zellen (R3) in einem Histogramm gegen die IL-4-Färbung aufgetragen. M1 signalisiert die IL-4-positiven Zellen.

CD4⁺-IgE-knock-in-Milzzellen

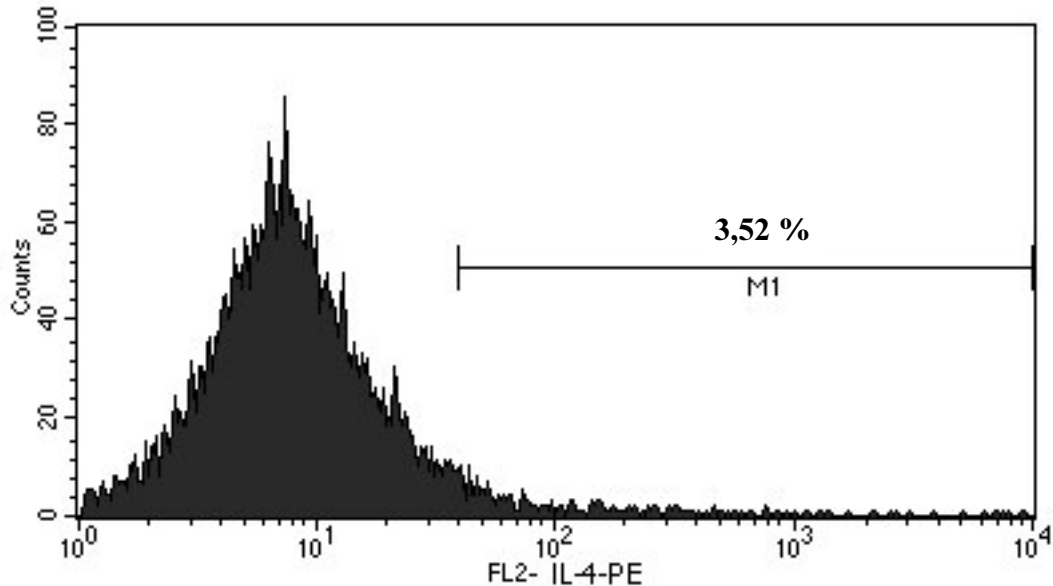


Abb. 43: Dargestellt wird ein Histogramm, in dem die CD4⁺-Zellen der IgE-knock-in-Milzzellen (Maus Nr. 194) gegen die IL-4-Färbung aufgetragen wurden. M1 signalisiert die IL-4-positiven Zellen. Die „Gates“ wurden im Vergleich zum Vorexperiment (vgl. Abb. 42) unverändert übernommen, so daß auf die erneute Darstellung der „Gates“ verzichtet wurde.

Tab. 4: Prozentuale Anteile der IL-4⁺- an CD4⁺-Milzzellen. Angegeben sind die Werte von je drei WT- und IgE-knock-in-Mäusen mit den verschiedenen Stimulationen (KLH oder anti-CD3) sowie die Durchschnittswerte.

| WT | KLH | anti-CD3 | IgE-knock-in | KLH | anti-CD3 |
|--------------|--------|----------|--------------|--------|----------|
| Maus 193 | 3,30 % | 5,34 % | Maus 194 | 2,52 % | 3,52 % |
| Maus 201 | 3,29 % | 4,16 % | Maus 195 | 2,58 % | 2,32 % |
| Maus 203 | 3,14 % | 3,16 % | Maus 199 | 2,81 % | 4,13 % |
| Durchschnitt | 3,24 % | 4,22 % | Durchschnitt | 2,64 % | 3,32 % |

Für die eben genannten Experimente wurde als Negativkontrolle eine Färbung mit einer Isotypkontrolle durchgeführt (Maus-IgG₁ mit Spezifität gegen das Hapten Trinitrophenol an einem nicht näher bezeichneten Protein, Pharmingen). Dies ist ein Antikörper, der keine Spezifität gegenüber einer Struktur in oder auf der zu untersuchenden Zellpopulation aufweist.

Es fanden sich bei gleichen Bedingungen und Gates in der FACS-Analyse 2,2 % IFN- γ - bzw. IL-4-, „positive“ Zellen.

Tab. 5: Als Negativkontrolle wurden Milzzellen mit einem Antikörper, der spezifisch gegen Trinitrophenol gerichtet ist, inkubiert und anschließend analog zu den o. g. Vorexperimenten ausgewertet. Die erhaltenen Ergebnisse (im Durchschnitt 2,22 %) resultieren somit aus einer unspezifischen Bindung.

| Isotypkontrolle | |
|-----------------|--------|
| Maus 197 | 1,85 % |
| Maus 199 | 2,57 % |
| Maus 201 | 2,25 % |
| Durchschnitt | 2,22 % |

Isotypkontrolle

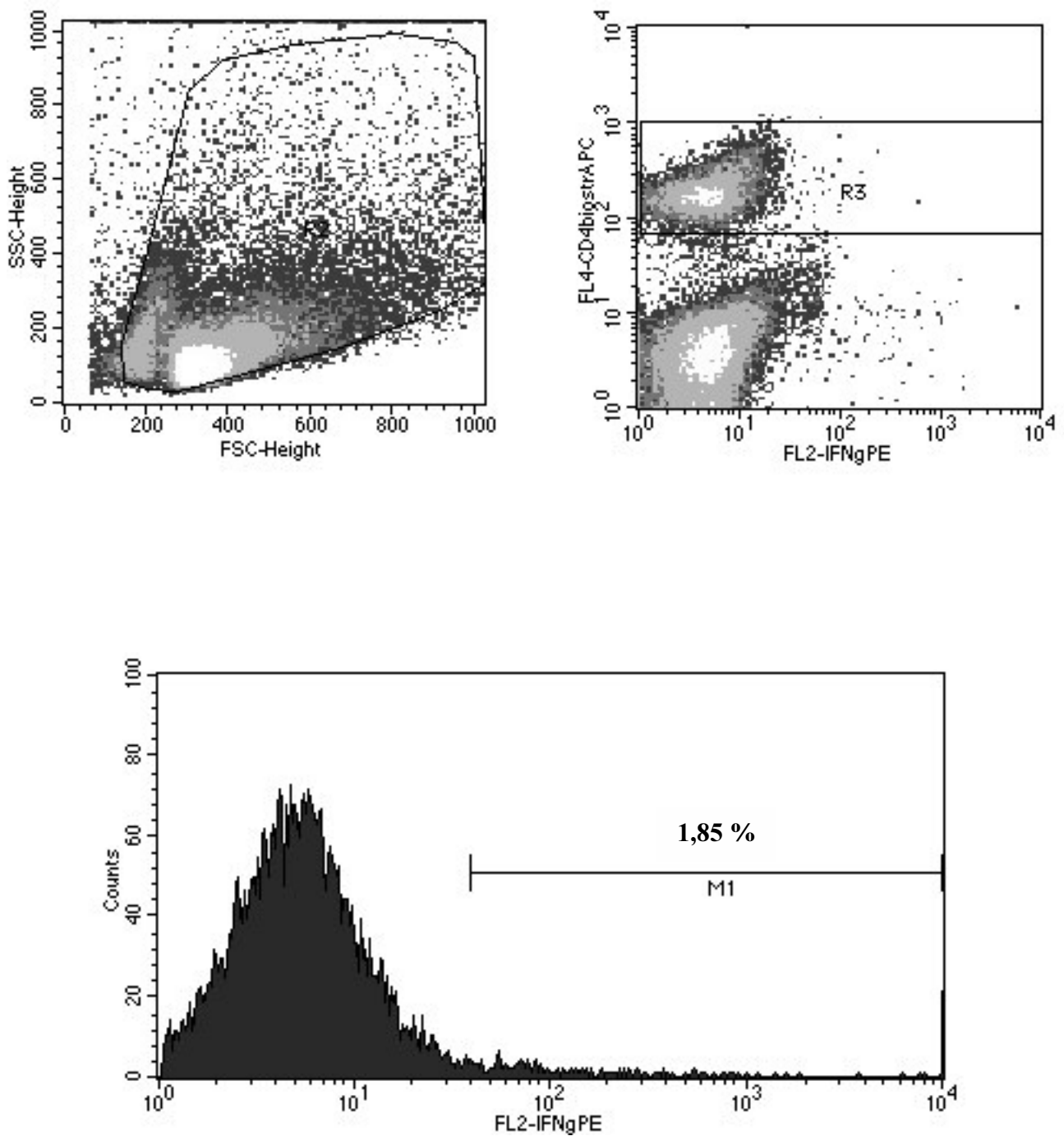


Abb. 44: Isotypkontrolle der WT-Maus Nr. 197. Milzzellen wurden mit einem spezifischen Ak gegen Trinitrophenol (als Negativkontrolle) analog zu den Vorexperimenten behandelt.

2.5.3. Analyse des Zytokinprofils von Milzzellen nach 72 h in-vitro-Stimulation mittels Zytokin-ELISA

Von den isolierten Milzzellen der mit DNP-KLH immunisierten Mäusen wurden jeweils 1×10^7 Zellen mit DNP-KLH und anti-CD3- ϵ für 72 Stunden in-vitro stimuliert (vgl. 2.5.2, Seite 80). Den Überstand untersuchten wir mittels ELISA auf die verschiedenen Zytokine (siehe Material und Methoden 2.10.).

2.5.3.1. Bestimmung von IFN- γ im Überstand von stimulierten Milzzellen

Mit Antigen (DNP-KLH) stimulierte WT-Milzzellen lieferten durchschnittlich 191 mU/ml IFN- γ , IgE-knock-in-Zellen 152 mU/ml im Überstand.

Stimulation von WT-Milzzellen mit anti-CD3- ϵ führte zu 135 mU/ml IFN- γ im Überstand. Bei IgE-knock-in-Milzzellen waren 116 mU/ml IFN- γ nachzuweisen.

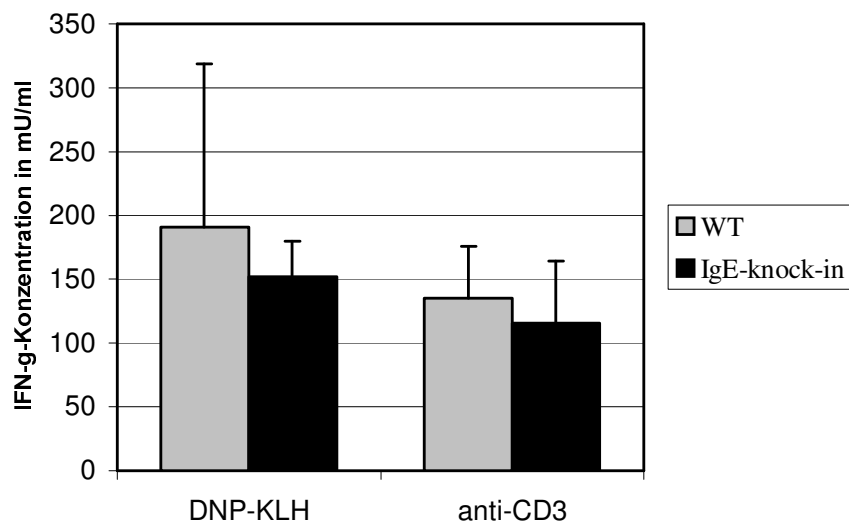


Abb. 45: Darstellung der IFN- γ -Konzentration (in mU/ml) im Überstand nach in vitro Stimulation von Milzzellen von WT- und IgE-knock-in-Mäusen mit DNP-KLH bzw. anti-CD3- ϵ .

2.5.3.2. Bestimmung von IL-4 im Überstand von stimulierten Milzzellen

Nach Stimulation von Milzzellen aus mehrfach mit DNP-KLH immunisierten Mäusen mit DNP-KLH waren im Überstand der WT-Milzzellen durchschnittlich 0,215 ng/ml IL-4 nachzuweisen. IgE-knock-in-Milzzellen produzierten 0,160 ng/ml IL-4.

Durch Stimulation der Milzzellen mit anti-CD3- ϵ war ein Absinken der IL-4-Konzentration von durchschnittlich 0,151 ng/ml bei WT-Milzzellen auf 0,144 ng/ml bei IgE-knock-in-Milzzellen zu verzeichnen.

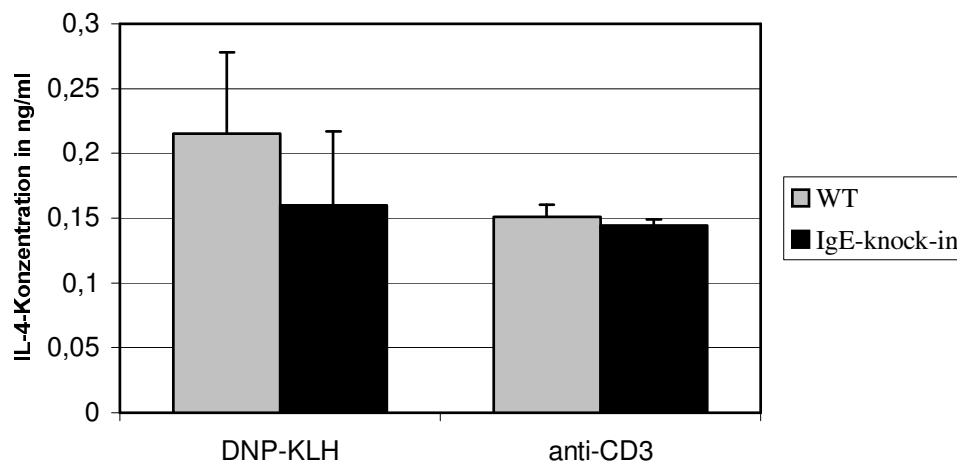


Abb. 46: Darstellung der IL-4-Konzentration (in ng/ml) im Überstand nach *in vitro* Stimulation von Milzzellen von WT- und IgE-knock-in-Mäusen mit DNP-KLH bzw. anti-CD3- ϵ .

2.6. Analyse von Leukozyten auf unterschiedliche Oberflächenmarker mittels FACS

Die Durchflußzytometrie ist eine herausragende Technik, mit deren Hilfe einzelne Zellen gleichzeitig auf verschiedene Parameter hin untersucht werden können, z.B. auf Größe und Granularität, auf Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern und auch auf intrazelluläre Strukturen.

Um Unterschiede in Knochenmarkszellen und Milzzellen von immunisierten WT- und IgE-knock-in-Mäusen herauszufinden, haben wir jeweils 1×10^6 Milzzellen mit verschiedenen Antikörpern gefärbt.

2.6.1. Mastzellen bzw. Mastzellvorläufer in WT- und IgE-knock-in-Mäusen

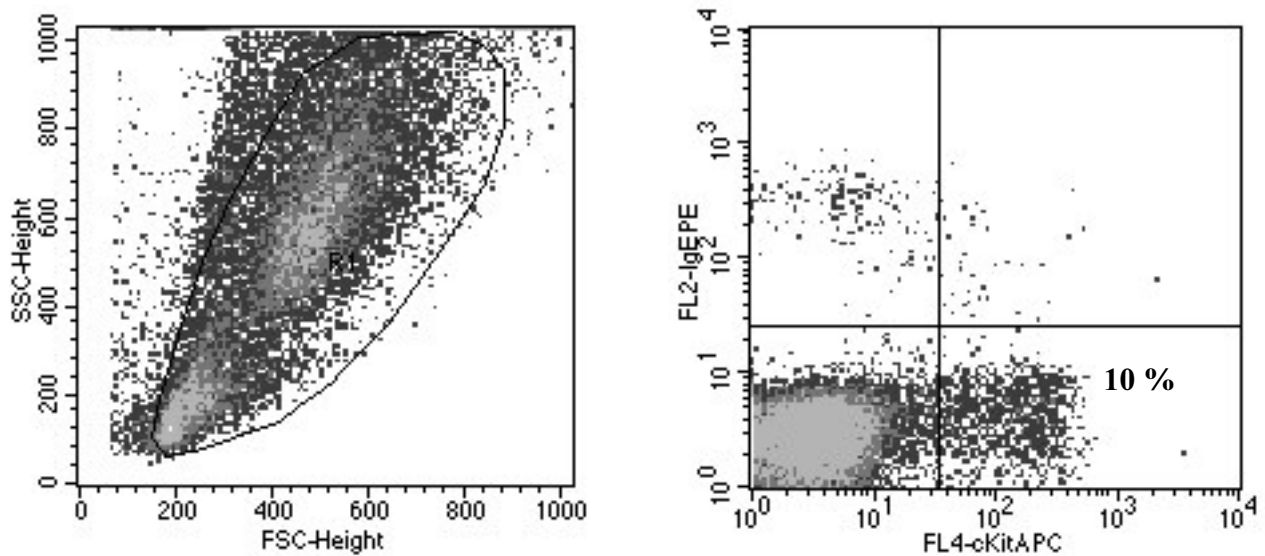
Dieses Experiment wurde mit einer Färbung mit anti-IgE und anti-CD117(c-kit) durchgeführt. C-kit ist ein Tyrosinkinaserzeptor für den c-kit-Ligand, der auch unter „Stammzellfaktor“ und „Mastzellwachstumsfaktor“ bekannt ist (Zsebo et al., 1990). C-kit wird auf vielen Vorläuferzellen der Hämatopoese (Katayama et al., 1993) und vor allem auf Mastzellvorläufern und Vorläuferzellen von basophilen Granulozyten exprimiert (Rodewald et al., 1996).

Außerdem wurden die Zellen mit einem Fc-Block-Antikörper (Pharmingen) behandelt, der eine unspezifische Bindung von unterschiedlichen Antikörpern an den Fc-Rezeptor auf Leukozyten verhindert (Unkeless, 1979; Ravetech et al., 1986).

Für das folgende Experiment wurden von WT- und IgE-knock-in-Mäusen je 25.000 Knochenmarkszellen und Milzzellen aufgenommen. Diese Mäuse wurden mehrmals mit 100 µg DNP-KLH i.p. und s.c. immunisiert.

Im Knochenmark der WT-Mäuse zeigte sich auf durchschnittlich 10 % der Zellen (nach Ausschluß von toten und unspezifisch angefärbten Zellen mittels eines "Gates") der Mastzell-Marker c-kit. Bei den IgE-knock-in-Mäusen waren 15 % positiv für c-kit. Dies entspricht einer Zunahme der Mastzellen bzw. ihrer Vorläufer im Knochenmark um 50 % in den IgE-knock-in-Mäusen.

WT-Knochenmarkszellen



IgE-knock-in-Knochenmarkszellen

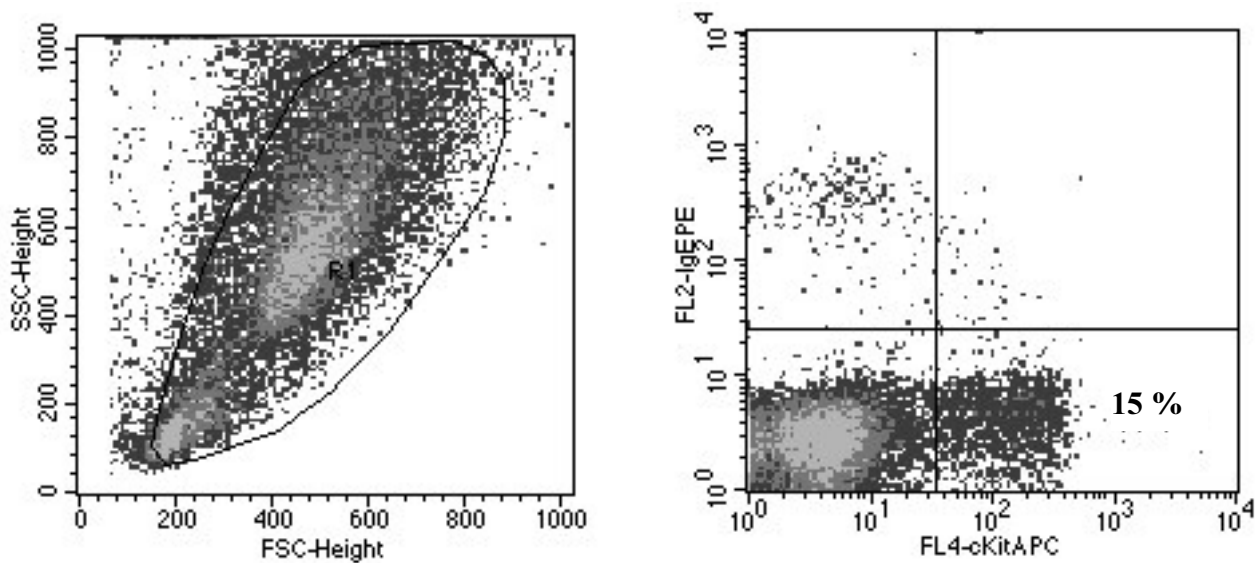


Abb. 47: Darstellung einer IgE/c-kit-Färbung von WT- und IgE-knock-in-Knochenmarkszellen. Oben links der Forward-Side-Scatter der WT-Knochenmarkszellen, oben rechts die c-kit/IgE-Färbung; unten links der Forward-Side-Scatter der IgE-knock-in-Knochenmarkszellen, unten rechts die c-kit/IgE-Färbung. Die Prozentzahlen geben den c-kit-positiven Anteil der KM-Zellen wieder.

In den Milzzellen der WT-Maus fanden sich 0,13 %, in denen der IgE-knock-in-Maus 0,33 % der Zellen für c-kit-positiv (nicht gezeigt).

2.6.2. Nachweis der vermehrten IgE-Produktion durch Bindung von IgE an den IgE-low-affinity-receptor (CD23)

CD23 hat eine 100- bis 1000fach niedrigere Affinität zu IgE als der FcεRI (Corry et al., 1999) und wird auf B-Zellen von Mäusen exprimiert. Durch 10-minütige Behandlung der CD23⁺-Zellen mit einem „Stripping-Buffer“ (0,13 M NaCl; 0,005 M KCl; 0,01 M Lactic acid (Sigma); pH 3,9) bei RT kann das an CD23 gebundene IgE abgelöst werden (Pruzansky et al., 1983).

Für dieses Experiment wurden 25.000 Milzzellen von WT- und IgE-knock-in-Mäusen mit anti-B220, anti-IgE und dem Fc-Block gefärbt. B220 - auch CD45R genannt - ist ein B-Zell-Marker (Allman et al., 1992).

Man fand bei den nicht mit Säure behandelten Milzzellen der IgE-knock-in-Mäuse bei 35 % aller Zellen eine gleichzeitige „Expression“ von B220 und IgE auf der Zelloberfläche. Bei den WT-Mäusen waren hingegen 3 % der Zellen für beide Marker positiv.

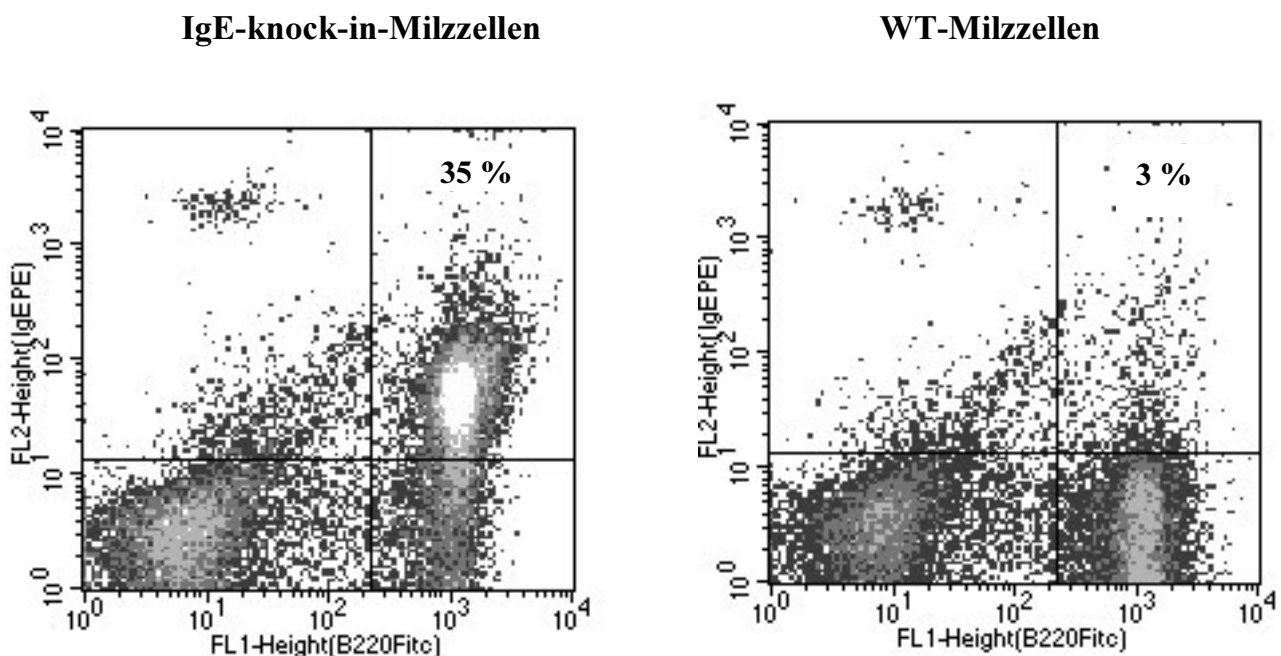


Abb. 48: Die Abbildungen zeigen nicht mit Lactic acid behandelte Milzzellen einer IgE/B220-Färbung. Links werden die IgE-knock-in-Milzzellen, rechts die IgE/B220-Färbung für die WT-Milzzellen gezeigt. Die Prozentzahlen geben den Anteil der doppelt positiven Zellen an allen analysierten Zellen wieder.

Nach Säurebehandlung mit dem Stripping-Buffer (Lactic acid) war zwischen IgE-knock-in- und WT-Mäusen kein Unterschied mehr nachzuweisen.

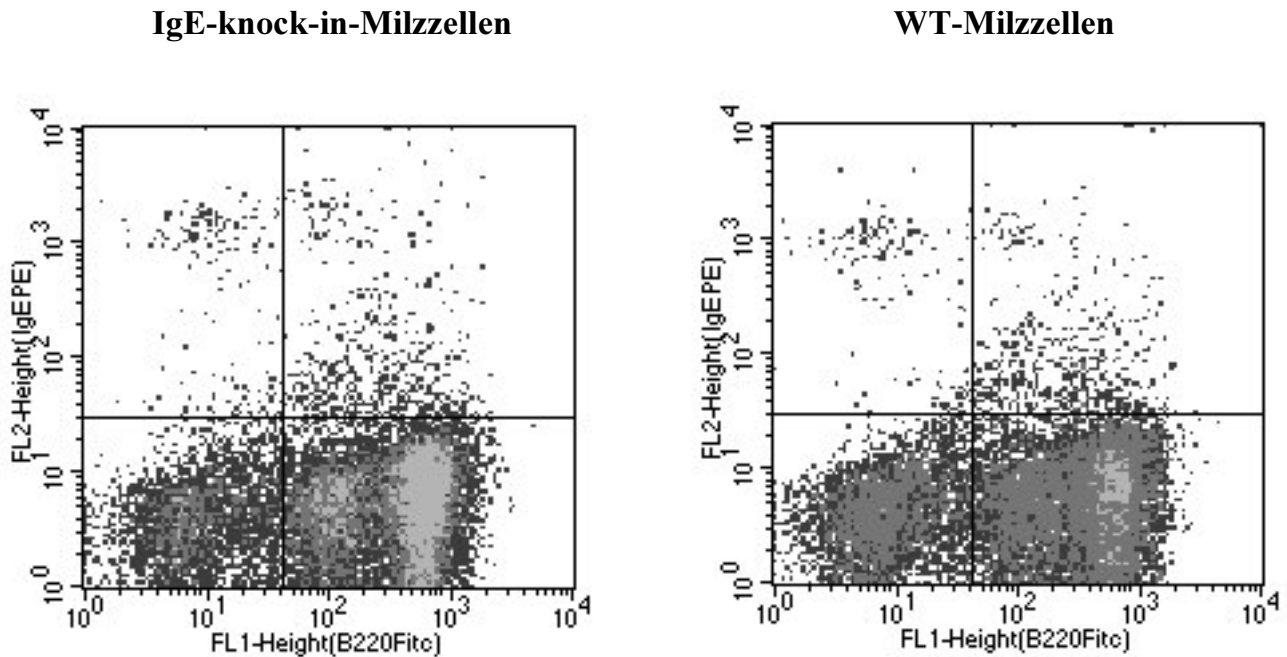


Abb. 49: Darstellung einer IgE/B220-Färbung von mit Lactic acid behandelten IgE-knock-in-Milzzellen (links) und WT-Milzzellen (rechts). Im Vergleich zum Vorexperiment (Abb. 48) fehlt hier die Population der doppelt positiven Zellen.

Außerdem erkennt man in Abb. 48 und Abb. 49 sowohl bei WT- als auch bei IgE-knock-in-Milzzellen eine konstante Population von Zellen, die zwar IgE, nicht aber B220 exprimieren und auf die das Strippen wenig Einfluß zeigt.

Zudem findet man nach Behandlung mit dem Stripping-Buffer eine B220^{low}-positive Population. Dieses Phänomen wird später diskutiert.

2.6.3. Nachweis einer vermehrten CD23-Expression im Knochenmark von IgE-knock-in-Mäusen.

Bei Anfärbung von Knochenmarkszellen mit anti-IgM und anti-CD23 fand sich bei den IgE-knock-in-Mäusen in 4,16 % der Zellen eine doppelte Anfärbung, bei WT-Knochenmarkszellen waren 0,92 % doppelt positiv. Somit zeigt sich eine mehr als vierfache Zunahme der CD23/IgM⁺-Zellen im Knochenmark der IgE-knock-in-Mäuse.

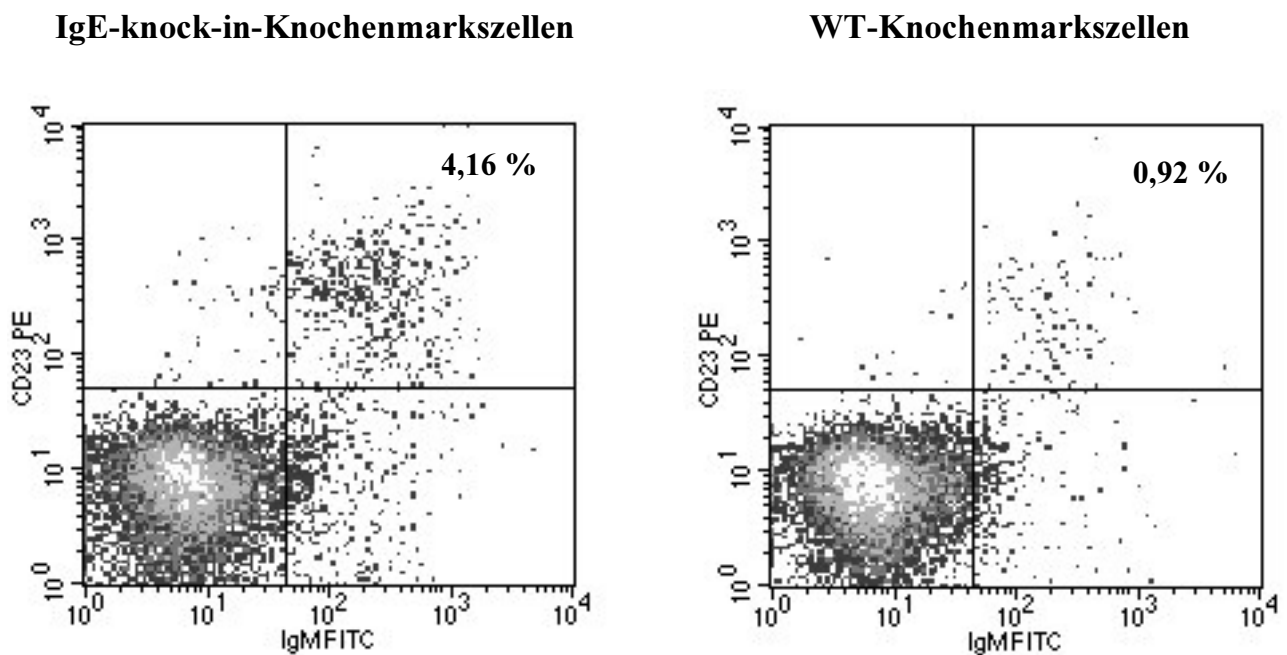


Abb. 50: Gezeigt wird eine CD23/IgM-Färbung von IgE-knock-in- und WT-Knochenmarkszellen. Links sieht man die IgM/CD23-Färbung der in die Analyse eingeschlossenen IgE-knock-in-Knochenmarkszellen. Rechts ist die IgM/CD23-Färbung der in die Analyse eingeschlossenen WT-Knochenmarkszellen gezeigt. Die Prozentzahlen geben den Anteil der doppelt positiven Zellen an allen analysierten Zellen wider.

Dieser Unterschied ist in Milzzellen nicht nachzuweisen. Allerdings erkennt man eine große Population (ca. 35 % der Gesamtzellen) CD23/IgM-positiver Zellen.

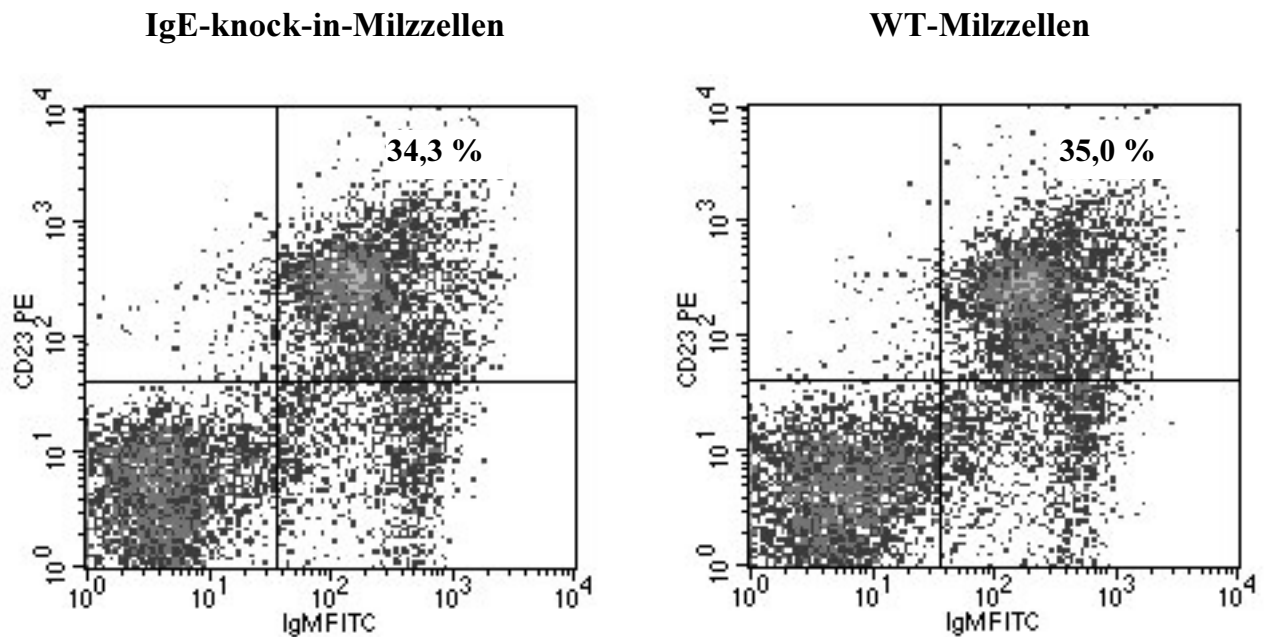


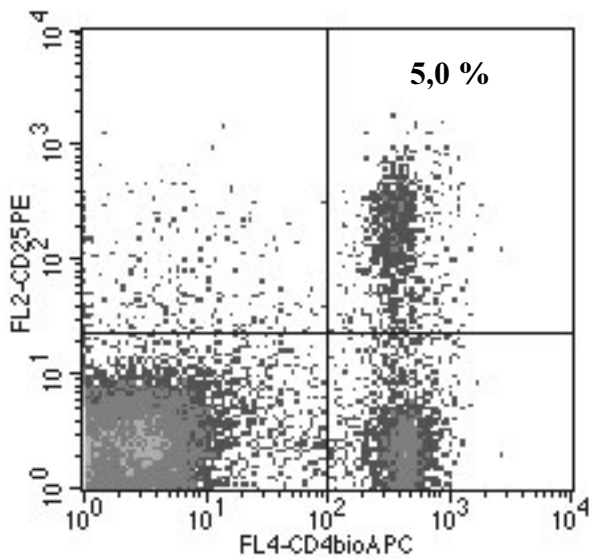
Abb. 51: Darstellung einer CD23/IgM-Färbung von Milzzellen. Links sind die anti-IgM/CD23 gefärbten Milzzellen der IgE-knock-in-Mäuse gezeigt, rechts die WT-Milzzellen. Die Prozentzahlen geben den Anteil der doppelt positiven Zellen an allen analysierten Zellen wider.

2.6.4. Nachweis von vermehrt CD4/CD25⁺-Milzzellen in IgE-knock-in-Mäusen

CD25 ist der niedrig-affine-IL-2 Rezeptor, der auf aktivierten T- und B-Lymphozyten exprimiert wird. Ruhende T- und B-Zellen und NK-Zellen exprimieren CD25 nicht. Vorübergehend findet man CD25 auch während der normalen B-Zell-Entwicklung im Knochenmark. In höheren Konzentrationen liegt CD25 während der frühen T-Zell-Entwicklung im Thymus vor (Ortega et al., 1984; Lowenthal et al., 1985).

So konnte durch die anti CD4/CD25-Färbung eine Population von Milzzellen identifiziert werden, die in IgE-knock-in-Mäusen doppelt so groß war (5 %) wie in WT-Milzzellen (2,6 %).

IgE-knock-in-Milzzellen



WT-Milzzellen

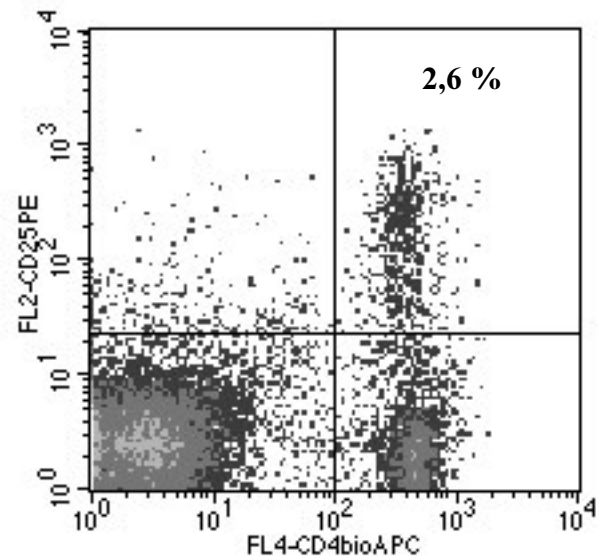


Abb. 52: Darstellung einer anti-CD25/CD4-Färbung von Milzzellen. Links ist die anti-CD4/CD25-Färbung der in die Analyse eingeschlossenen Milzzellen der IgE-knock-in-Mäuse, rechts die anti-CD4/CD25-Färbung der WT-Milzzellen dargestellt. Die Prozentzahlen geben den Anteil der doppelt positiven Zellen an allen analysierten Zellen wieder.

2.6.5. Färbung von Milzzellen und Thymuszellen mit anti-CD4/anti-CD8

Bei IgE-knock-in-Milzzellen waren 9,70 %, bei WT-Milzzellen 6,49 % allein für CD4 positiv. Bei der IgE-knock-in-Maus ließen sich 7,86 % CD8⁺-Milzzellen detektieren. In WT-Milzzellen waren 6,36 % für CD8 positiv.

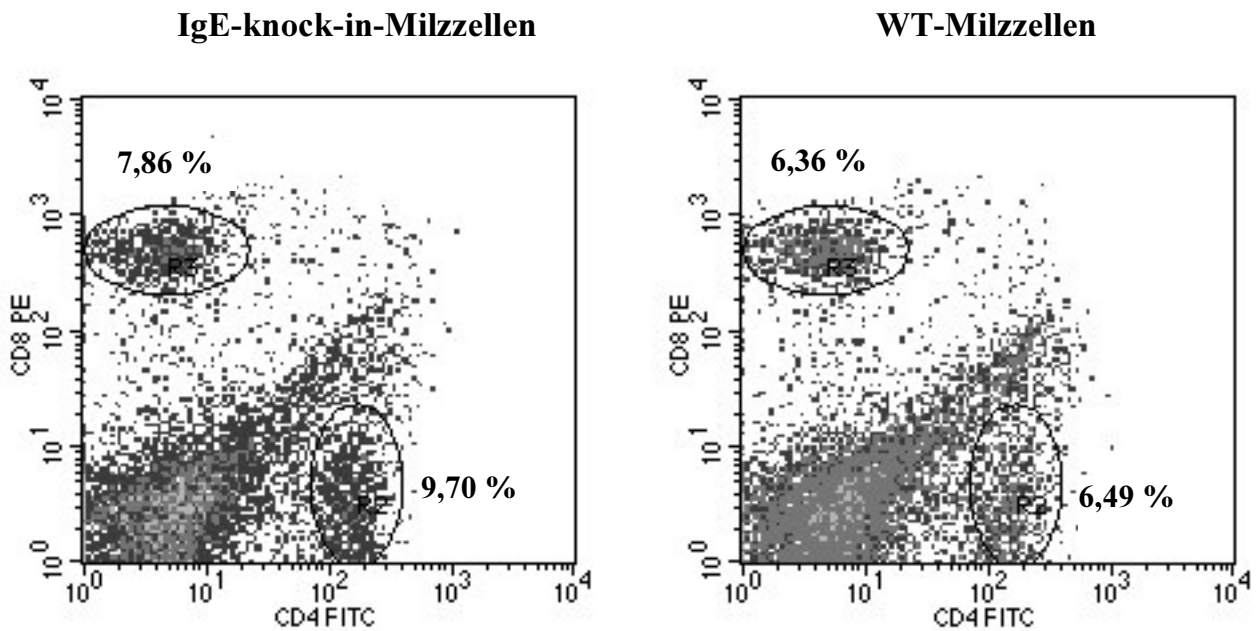


Abb. 53: Darstellung einer CD4/CD8-Färbung von Milzzellen. Links die IgE-knock-in-, rechts die WT-Milzzellen.

In den Thymuszellen einer IgE-knock-in-Maus waren für CD4 alleine 8,40 % und für CD8 alleine 4,36 % positiv. 62,7 % der Thymuszellen waren für beide Oberflächenmarker positiv. Bei WT-Thymuszellen waren 3,90 % für CD4 alleine, 2,47 % für CD8 alleine und 75,2 % für CD4 und CD8 positiv.

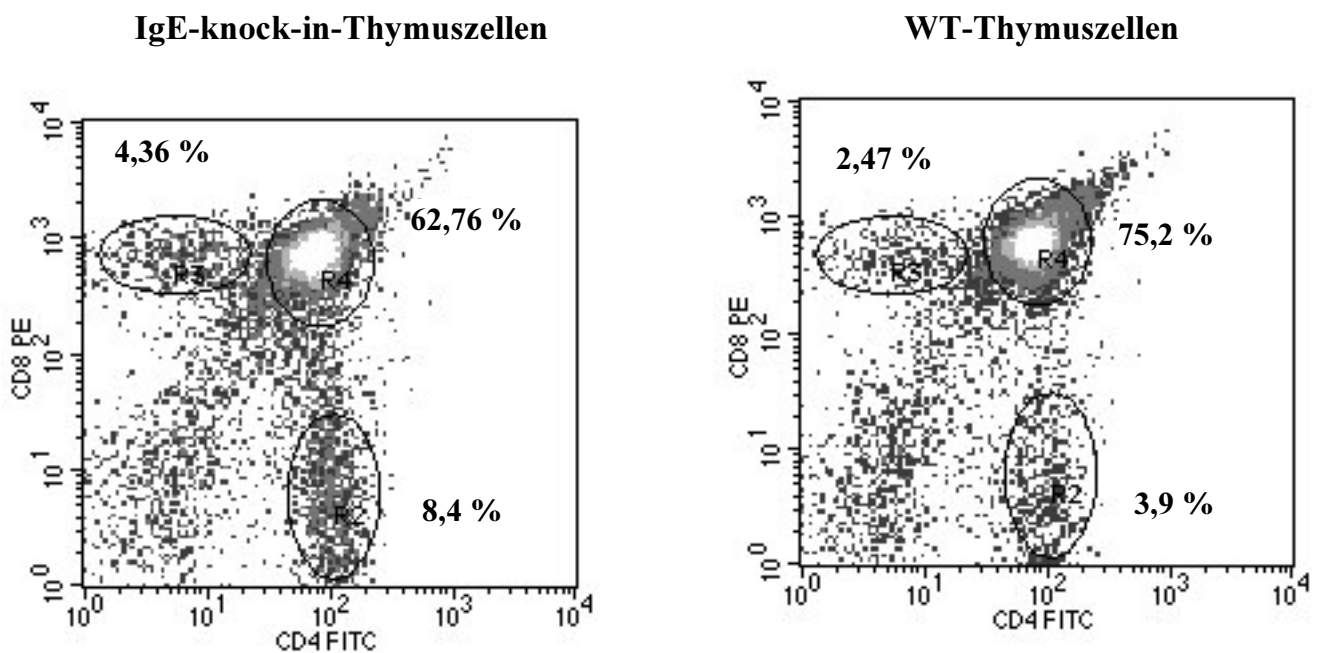


Abb. 54: Gezeigt ist eine CD4/CD8-Färbung von Thymuszellen. Links die IgE-knock-in-Thymuszellen, rechts die WT-Thymuszellen.

D DISKUSSION

1. Einleitung

Spontanmutationen mit ihrer hohen Frequenz von 10^{-4} bis zu 10^{-9} pro Generation gefährden die Integrität der Genome aller Lebewesen. Prokaryonten, wie z.B. Bakterien, behelfen sich durch schnelle Generationszeit und große Populationen. Ist ein Bakterium von einer Mutation betroffen, so ist für die gesamte Population von geringerer Bedeutung, da immer noch eine große Zahl nicht mutierter Organismen vorhanden ist.

Völlig anders ist die Situation bei Vielzellern, besonders bei komplexen Organismen wie Säugetieren. Sollte hier in einer einzelnen Zelle in der frühen Entwicklung des Organismus eine Mutation auftreten, die das betreffende Gen inaktiviert, kann dies Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben. Neben der Vielzahl verschiedener Reparaturmechanismen diesbezüglich hat sich die Redundanz vieler Gene in der Funktion bewährt. Auch haben viele Genprodukte eine ausgeprägte pleiotrope Wirkung, die sich mit der Wirkung homologer oder zu einer Familie gehörender Proteine überschneiden kann.

Im Immunsystem höherer Organismen, wie Mensch und Maus, sind wichtige Funktionen nur selten auf ein Gen zurückzuführen. So kommt es durch einen Ausfall einzelner Genen nicht automatisch zu bedrohlichen Beeinträchtigungen der Immunabwehr. Beispielsweise sind Menschen, denen durch Deletion in der Region der Schweren Kette verschiedene AK-Isotypen verlorengegangen sind, gesund (Migone et al., 1984; Lefranc et al., 1991).

Diese Tatsache verursacht aber auch Schwierigkeiten bei der Untersuchung einzelner Genfunktionen in-vivo. Selbst die Möglichkeit, einzelne Gene im Genom der Maus gezielt zu verändern, führt zu Problemen in der Beschreibung der Effekte des veränderten Genlocus (Rajewsky, 1992).

Das Problem ist die Entdeckung der phänotypischen Veränderung der Maus. Hierbei müssen Experimente aus verschiedenen Fachbereichen durchgeführt werden, um die Funktion des jeweiligen Genproduktes ermitteln zu können.

Ein weiteres, nicht zu unterschätzendes Problem betrifft die Vorhersagen zur Funktion eines Gens aufgrund vorausgegangener Experimente. In vielen Fällen konnten sich Schlußfolgerungen nicht bewahrheiten. Dies mag daran liegen, daß die zugrundeliegenden Experimente in-vitro durchgeführt wurden. Hierbei wird durch eine Reduktion der Komplexität eine unzulässige Verfälschung erzeugt.

Moderne Methoden, wie z. B. das „Differential-Display“ (Lisitsyn et al., 1993), ermöglichen Untersuchungen von komplexen Expressionsmustern und ebnet dadurch neue Wege in der Analyse.

Die IgE vermittelte Freisetzung von Mastzellmediatoren als Antwort auf ein Allergen galt bis Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts als grundlegendes Ereignis einer Typ I - Überempfindlichkeitsreaktion, beispielsweise der systemischen Anaphylaxie. Bis zu diesem Zeitpunkt wußte man zwar, daß basophile Granulozyten und Mastzellen in-vitro auch durch nicht-IgE-Stimuli aktiviert und zur Degranulation gebracht werden können, über eine Aktivierbarkeit dieser Zellen in-vivo war bis dato jedoch wenig bekannt. So publizierte Oettgen et al. 1994, daß in Mäusen, die kein IgE mehr synthetisieren können, trotzdem noch systemische Anaphylaxie nach Immunisierung mit Antigen ausgelöst werden kann.

Diese wichtige und neue Beobachtung wurde an Mäusen gemacht, die durch einen knock-out die Fähigkeit zur IgE-Produktion verloren haben.

Ein klassischer Weg zum Verständnis der Genfunktion ist die Herstellung einer transgenen Maus, die das zu untersuchende Genprodukt überexprimiert. Erfolgreich wurde dieses Verfahren z. B. bei der Untersuchung der Funktion von IL-4 angewendet (Burstein et al., 1991).

Die Problematik bei Immunglobulin-transgenen Tieren liegt in der monoklonalen Spezifität, die der biologisch funktionellen Variabilität der Antikörper widerspricht (Imanishi-Kari et al., 1993; Roth et al., 1993).

IgE-Überexpression als Strategie zur Erforschung der Allergie wird bereits seit einigen Jahren verfolgt. So etablierte Adamczewski et al. (1991) eine transgene Mauslinie, die monoklonales nicht spezifisches IgE überexprimiert. Dies wurde durch zufällige Insertion der codierenden Sequenz für die Schwere Kette des IgE-Isotypes in das Genom der Maus erreicht. Durch das Fehlen einer transgenen Leichten Kette konnten

in diesem Modell keine allergischen Reaktionen durch Auseinandersetzung mit einem Antigen untersucht werden.

1999 wurde von Matsuoka et al. die Beschreibung einer Mauslinie veröffentlicht, die sowohl die Schwere Kette als auch die Leichte Kette des IgE-Isotypes als Transgen in das Genom integriert hat. Das in diesen Mäusen gebildete rekombinante IgE wies eine Spezifität gegen TNP (Trinitrophenol - ein Hapten) auf.

Durch die zufällige Integration des Transgenes in das Genom der Maus mit dem sich daraus ableitenden Problem der Regulierung der Synthese des Genproduktes, der postulierten konstitutiven Produktion von rekombinantem IgE und der monoklonalen Spezifität liefern diese Tiermodelle einen unzureichenden Einblick in die Regulation der IgE-Synthese bei Allergie und haben deshalb nur eine eingeschränkte Aussagekraft bezüglich der Regulation von Allergieentstehung.

Wir haben eine im Vergleich zum klassischen knock-out neuere Methode angewandt, die uns Einblicke in die Regulierung einer allergischen Immunantwort durch IgE liefern kann. So wurde durch einen knock-in eine Mauslinie etabliert, die antigenspezifisches IgE überexprimieren kann. Dies wurde durch Austauschen der Sequenz der Schwere Kette des IgG₁-Isotypes durch die DNA-Sequenz der Schwere Kette des IgE-Isotypes erreicht. Durch den gezielten Austausch der codierenden Abschnitte wurde im Gegensatz zu den bereits geschilderten Transgenen eine örtlich genau definierte Mutation im Immunglobulingenlocus generiert. Ziel war es, den IgE-Isotyp, der in der Wildtypmaus und im Menschen einer stringenten Kontrolle unterliegt, den regulatorischen Elementen des IgG₁-Isotypes zu unterstellen und so durch normalerweise nicht IgE induzierende Stimuli eine übermäßige Expression in-vivo zu ermöglichen.

2. Herstellung von Mäusen, die spezifisches IgE überexprimieren

Durch die Technik der homologen Rekombination wurde eine Balb/c-1-ES-Zelllinie und eine E14.1-ES-Zelllinie mutiert. Die genomische Konfiguration der Schwere Kette des IgE-Isotypes wurde an die Stelle der Schwere Kette des IgG₁-Isotypes gesetzt.

Hierbei wurde auf die Mitnahme der IgE-Membranexons und der 3'untranslatierten Region verzichtet, da über die Benutzung der IgG₁-Membranexons sozusagen ein chimärer Antikörper - IgE mit IgG₁-Membranexons in der Zellmembran verankert - entstehen kann. Dies ist wichtig, weil Achatz et al. (1997) gezeigt hat, daß lösliches spezifisches IgE erst dann entstehen kann, wenn vorher spezifisches IgE als membrangebundener Antikörper vorgelegen hat. Ein Problem liegt in der Tatsache, daß weder im IgE-transgenen-Mausmodell (Adamczewski et al., 1991; Matsuoka, et al., 1999) noch in der hier vorgestellten Arbeit membranständiges IgE (mIgE) wirklich nachzuweisen ist. Auch gelang es bisher kaum, Zellen, die mIgE tragen, zu isolieren und genauer zu untersuchen. Dies ist ein Beleg für die stringente Regulation der mIgE-Expression. Durch die Verwendung der IgG₁-Membranexons wollten wir diese strengen Kontrollmechanismen umgehen. Dies gelang uns nicht, denn nach Immunisierungen konnten wir mittels FACS in IgE-knock-in-Mäusen kein vermehrt membranständiges IgE nachweisen.

Des weiteren wurde - wie schon angedeutet - die Sequenz des IgE-Isotypes bewußt unter die Kontrolle der regulatorischen Elemente des IgG₁-Isotypes gestellt, wodurch IgE durch Stimuli, die normalerweise zur Expression von IgG₁ führen, überexprimiert werden kann.

Um die genetisch veränderten ES-Zellen zu identifizieren, wurden die ES-Zell-Klone zuerst in 5er-Gruppen und anschließend einzeln mit einer nested-PCR untersucht. Von den PCR positiven Klonen wurde genomische DNA mit Hilfe von Southern-Blots auf korrekte Integration der Mutation hin untersucht. Mit einer radioaktiv markierten Probe und zwei verschiedenen Restriktionsenzymen konnte die gewünschte homologe Rekombination bestätigt werden. Diese veränderten ES-Zelllinien wurde in C57BL/6-Blastozysten injiziert.

Der injizierte E14.1 Klon war kein Keimbahntransmitter. Beide injizierten Balb/c-1-Klone gaben die Mutation an ihre Nachkommen weiter. Die heterozygoten chimären Mäuse wurden mit cre-Deleter-Mäusen (Schwenk et al., 1995) verpaart. Nach Identifikation der Mäuse mit kompletter cre-Deletion wurden diese wieder mit Balb/c-Mäusen verpaart. Ziel hiervon war es, den genetischen Hintergrund des Blastozysten (C57/BL6) und Anteile aus 129/Ola (cre-Deleter-Mäuse) zu minimieren. C57/BL6 und 129/Ola sind „low responder“ für IgE. Dies kann ein Problem für den IgE-Nachweis

darstellen, denn selbst in 6 - 8 Wochen alten Tieren können nur ca. 100 ng IgE/ml Serum gefunden werden. Für weitere Untersuchungen wurden die Mäuse auf den Balb/c-Hintergrund zurückgekreuzt. Balb/c gehört zu den „high respondern“ in Bezug auf IgE-Expression. Die untersuchten IgE-knock-in-Mäuse wurden unter SPF Bedingungen gehalten.

3. IgE in unbehandelten Mäusen

Bei den unimmunisierten IgE-knock-in-Mäusen war fünfmal so viel lösliches IgE zu verzeichnen wie bei den WT-Mäusen.

Dies stellt zwar einen signifikanten Unterschied dar, aber in Anbetracht der Tatsache, daß die Konzentration von IgG₁ - an dessen Stelle IgE exprimiert wird - im Serum von unbehandelten WT-Mäusen mindestens 1.000mal größer ist als die Konzentration von IgE, hätte man durchaus mehr erwarten können.

Ein Unterschied in dieser Größenordnung wäre unter der Voraussetzung zu erwarten gewesen, wenn man vereinfacht annimmt, daß die IgE-Sequenz unter den regulatorischen Elementen des IgG₁-Isotypes steht und sonst keinerlei Veränderungen in der Regulation der Transkription stattfinden.

Es ist bekannt, daß nicht nur Intronstrukturen Einfluß auf die Transkription nehmen, sondern auch Exons. Durch die genetischen Veränderungen wurden zwar die 5' gelegenen regulatorischen Sequenzen des IgG₁-Isotypes unverändert übernommen, aber durch die eingefügte IgE-Sequenz (sowohl Intron- als auch Exon-Strukturen) könnte eine negative Beeinflussung der Transkription bzw. sich daraus ableitend der Translation in diesem Ausmaß erklärt werden.

Ein weiterer möglicher Grund der nicht allzu drastischen IgE-Überproduktion liegt evtl. im niedrig affinen IgE-Rezeptor FcεRII (CD23). So wurde von Yu et al. (1994) ein negativer regulatorischer Effekt von CD23 auf die IgE-Produktion postuliert. Es fanden sich in Mäusen, die kein CD23 mehr exprimieren konnten, erhöhte IgE-Spiegel. Dieser Effekt scheint aber erst bei sehr hohen Serum-IgE-Titern eine wichtige Rolle zu spielen, was erklären könnte, warum in einigen Studien, vermutlich durch weniger drastische allergische Provokationen, kein Effekt von CD23 auf die IgE-Synthese zu verzeichnen war (Corry, 1999).

Wir konnten mit FACS-Analysen bei IgE-knock-in-Mäusen viermal mehr CD23⁺ Zellen im Knochenmark nachweisen. Eine Erklärung dieser Tatsache könnte der Schutz von CD23 vor proteolytischem Abbau durch gebundenes IgE sein (Lee et al., 1987). Die B-Zellen der Milz unterschieden sich im CD23-Expressionsmuster nicht mehr. Hier dürfte der protektive Effekt von IgE auf CD23 bei der Vielzahl von CD23⁺ B-Zellen nicht mehr so ins Gewicht fallen wie im Knochenmark.

Im Widerspruch dazu fand Matsuoka et al. (1999) in dem von ihm beschriebenen IgE-transgenen-Mausmodell eine deutliche Zunahme von CD23 auf Milzzellen.

Nicht unbeachtet bleiben dürfen die unterschiedlichen Halbwertszeiten von IgE und IgG₁. So liegt die Halbwertszeit von IgE bei 12 Stunden, die von IgG₁ bei 192 Stunden (Viera et al., 1988).

Man kann annehmen, daß die Abbaugeschwindigkeit R_a der Immunglobulin-konzentration proportional ist und einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung folgt.

$$Ra = k \cdot c$$

Die Geschwindigkeitskonstante der Abbaureaktion ist:

$$k = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}$$

Da die Konzentration von Immunglobulinen im Serum über den Zeitraum von Stunden und Tagen konstant bleibt, wird der Antikörper etwa gleich schnell abgebaut wie neu synthetisiert.

$$Ra = Rs$$

Setzt man nun eine gleiche Syntheserate R_s beider Immunglobuline voraus, läßt sich durch einfaches Einsetzen folgende Rechnung aufstellen:

$$\begin{aligned} Rs &= k \cdot c = Ra \\ k &= \frac{\ln 2}{T_{1/2}} \\ Rs_{IgE} &= Rs_{IgG_1} \\ \Rightarrow \frac{c_{IgE}}{c_{IgG_1}} &= \frac{T_{1/2 IgE}}{T_{1/2 IgG_1}} = \frac{12}{192} = \frac{1}{16} \end{aligned}$$

Dies veranschaulicht, daß bei gleicher Syntheserate beider Immunglobuline die Konzentration von IgG₁ allein aufgrund der unterschiedlichen Halbwertszeiten 16mal höher ist als die von IgE.

Bei Betrachtung der Immunglobulinkonzentrationen in nicht immunisierten IgE-knock-in-Mäusen von 0,9 µg/ml IgE und 140 µg/ml IgG₁ ergibt sich ein Konzentrations-verhältnis von 1/160. Folglich existieren Mechanismen, die die Expression von IgE nachhaltig beeinflussen und so den Unterschied von 1/16 bei alleiniger Betrachtung der Halbwertszeit und dem tatsächlichen Unterschied von 1/160 bedingen. Dies können neben Veränderungen im regulatorischen Ablauf der Immunglobulin-expression auch Veränderungen in der Zellzahl von Immunglobulin produzierenden Zellen sein.

Ein weiterer wichtiger Grund für die „moderate“ IgE-Überproduktion dürfte in einer Veränderung des Zytokinprofiles liegen. So würde eine in IgE-knock-in-Mäusen verminderte IL-4-Produktion den Klassensprung hin zu IgG₁ und IgE weniger wahrscheinlich werden lassen.

Wie schon angedeutet, könnte auch die Verwendung der IgG₁-Membranexons für die niedrigeren IgE-Spiegel verantwortlich sein. Die Arbeit von Achatz (Achatz et al., 1997) belegt die Notwendigkeit der IgE-Membranexons für die später sezernierten löslichen IgE-AK. Durch das mit IgG₁ codierten Strukturen in der Zellmembran verankerte IgE könnten Störungen in der Regulation der Expression von löslichem IgE erklärt werden.

4. In-vitro-Stimulation

Erst nachdem WT-Mäusen mit LPS + 500 U IL-4 stimuliert wurden, konnte IgE nachgewiesen werden (4 µg/ml). Diese Experimente bestätigen die wichtige Funktion von IL-4 im Klassensprung hin zu IgE (Snapper et al., 1988).

Daneben fördert IL-4 auch die IgG₁-Produktion bzw. den Klassensprung hin zum IgG₁. Dies ist interessant, weil bei den IgE-knock-in-Mäusen anstelle eines IgG₁-Alleles ein IgE-Allel gesetzt wurde und somit anstelle von IgG₁ IgE synthetisiert wird. So konnte bei den IgE-knock-in-Mäusen nach Stimulation mit LPS alleine schon IgE nachgewiesen werden, während sich IgE in WT-Mäusen nicht nachweisen ließ.

Snapper zeigte, daß LPS ruhende Milzzellen zur Produktion von IgG₁ anregt (Snapper et al., 1987). Somit wurde die Funktionalität unserer Mauslinie in Bezug auf IgE-Produktion durch IgG₁-Stimuli belegt.

Erst bei Zugabe von 500 U/ml IL-4 konnten wir auch in WT-Mäusen IgE nachweisen. Von den IgE-knock-in-Mäusen wurde bei dieser Stimulation 16 µg/ml mehr IgE produziert.

Neben steigenden IgE-Titern fand man mit zunehmender IL-4 Konzentration auch ansteigende IgG₁-Titer, allerdings waren die Überstände von IgE-knock-in- bzw. WT-Milzzellen nicht unterscheidbar. Idealerweise hätte man bei den IgE-knock-in-Milzzellen halb soviel IgG₁ erwartet, da ja ein γ_1 -Allel durch IgE ersetzt wurde. Unsere Ergebnisse machen deutlich, daß es regulatorische Mechanismen geben muß, die z. B. die Transkription bzw. Translation des nicht veränderten IgG₁-Locus fördern. Einer dieser Mechanismen könnte IL-4 sein, durch dessen Wirkung das Fehlen eines IgG₁-Allels kompensiert werden kann. Hier möchte ich darauf hinweisen, daß in diesem Experiment keine gereinigten B-Zellen, sondern nicht aufbereitete Milzzellen verwendet wurden. Zwar wird durch Stimulation mit LPS das Wachstum von B-Zellen stimuliert, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß T-Zellen in dieser Kultur Zytokine produzieren und so Veränderungen in der Antikörperantwort entstehen.

Interessanterweise waren bei LPS- und maximaler IL-4-Stimulation 8 µg/ml IgG₁ (im Vergleich zu 16 µg/ml IgE) sowohl bei WT- als auch in IgE-knock-in-Mäusen zu messen. Dies deutet darauf hin, daß das auf einem Allel zusätzlich eingesetzte IgE viel besser transkribiert bzw. translatiert wird als die endogenen IgG₁-Allele.

Eine Erklärung könnten - wie bereits angedeutet - die genetischen Veränderungen mit einem stark positiven regulatorischen Einfluß auf die Transkription bzw. Translation sein.

Ein weiterer Grund könnte in Veränderungen von Zytokin-Konzentrationen liegen, z.B. in vermehrter IL-4-Produktion der T_{H2}-Zellen von IgE-knock-in-Mäusen, wodurch vermehrt IgE durch den IL-4 vermittelten Klassensprung hin zu IgG₁ synthetisiert wird.

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß andererseits konstant höhere (hier 16fach) IgG_{2a}-Spiegel im Überstand der IgE-knock-in-Milzzellen nachzuweisen waren.

Dieses Phänomen könnte zum einen Ausdruck einer z. B. erhöhten IFN- γ -Produktion sein. IFN- γ fördert als typisches T_{H1}-Zytokin die IgG_{2a}-Produktion von B-Zellen.

Gleichzeitig ist bekannt, daß IFN- γ antagonistisch auf die IL-4 vermittelte IgE-Produktion wirkt (Pene et al., 1988). Dieses Paradoxon könnte durch vertiefte Analysen des Zytokinexpressionsmusters, z. B. IL-13, aufgelöst werden.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die erhöhte in-vitro-Produktion von IgG_{2a} unabhängig davon in den Immunisierungen in-vivo nachvollzogen werden konnte. Dies könnte darauf hindeuten, daß das Paradigma der Wechselwirkung von IL-4 und IFN- γ auf die IgE-Produktion in bestimmten Situationen (z. B. bei erhöhten IgE-Spiegeln) nicht haltbar ist.

Zusätzlich ließe sich die vermehrte IgG_{2a}-Produktion wiederum durch die genetischen Veränderungen per se erklären: Durch negative regulatorische Einflüsse der inserierten Sequenzen und daraus folgend einer teilweisen Hemmung des Klassensprunges zu IgE (an der Stelle von IgG₁) könnten ersatzweise im Immunglobulingenlocus „downstream“ gelegene loci verwendet werden. Solche loci sind IgG_{2b} und IgG_{2a} (siehe Abb. 4, S. 41).

Um die sezernierten Immunglobuline in Beziehung zu den sie produzierenden Zellen bringen zu können, haben wir die Milzzellen mit Peroxidase markierten Antikörpern gegen verschiedene Immunglobuline angefärbt.

Für die IgE produzierenden Milzzellen fanden wir eine gute Übereinstimmung mit den im Überstand gemessenen AK-Spiegeln mit maximaler Zellzahl bei Stimulation mit LPS und 500 U IL-4 und keine angefärbten WT-Milzzellen bei Stimulation mit wenig IL-4 (50 U/ml).

Interessanterweise ließen sich in den IgE-knock-in-Mäusen stets halb so viele Zellen mit anti-IgG₁ anfärben wie in den WT-Milzzellen. Hier spiegelt sich also das Fehlen eines IgG₁-Alleles in der verminderten Zellzahl wider.

Der bei der Untersuchung der Überstände deutliche Unterschied in den IgG_{2a}-Spiegeln zw. WT- und IgE-knock-in-Milzzellen konnte anhand der mit anti-IgG_{2a} angefärbten Zellen nicht nachvollzogen werden.

Zusammenfassend muß hier darauf hingewiesen werden, daß die markierten AK gegen intrazelluläre AK gerichtet sind und daß dadurch der Unterschied zwischen sezernierten (also im Überstand gemessenen AK) und mit Peroxidase-AK angefärbten Zellen zu erklären ist.

5. Immunisierung

Nach Immunisierung mit OVA und CFA bzw. nach Reimmunisierung mit OVA und inkompletem Freund'schen-Adjuvans ist bei den WT-Mäusen ein Absinken der sehr niedrigen IgE-Titer zu erkennen. Dies läßt sich durch das Immunisierungsprotokoll erklären: CFA ist für die Beeinflussung des Zytokinprofiles in Richtung T_{H1}-Zytokine (z.B. IFN- γ) bekannt. Dies wirkt hemmend auf die IgE-Produktion (Pene et al., 1988).

Anders ist es bei den IgE-knock-in-Mäusen. Die bis zu 600fach höheren IgE-Titer zeigten ihr Maximum jeweils nach den Reimmunisierungen. Hier spiegelt sich das physiologische Verhältnis der Immunglobulinkonzentrationen der Maus wider. Die IgG₁-Konzentration liegt im Bereich von mg/ml, die IgE-Konzentration von μ g/ml. Zu diesen beträchtlichen Unterschieden führen die unterdrückte endogene IgE-Produktion und die Insertion eines zusätzlichen IgE-Allels an IgG₁-Stelle.

Das starke Abfallen der IgE-Titer nach den Reimmunisierungen ist Folge der bereits erwähnten kurzen Halbwertszeit für IgE.

Für die stets ansteigenden IgG_{2a}-Titer bei den IgE-knock-in-Mäusen dürfte neben den bei dem In-vitro-Experiment erwähnten Gründen hier in besonderem Maße das Immunisierungsprotokoll mit OVA und CFA ausschlaggebend sein.

Die ansteigenden IgG_{2a}-Titer nach CFA-Immunisierung stehen im Widerspruch zu Beobachtungen, die Adamczewsky mit seinem IgE-transgenen-Mausmodell gemacht hat. Er stellte ein Absinken der IgG_{2a}-Spiegel fest. Als Ursache hierfür vermutete er eine defekte IFN- γ -Produktion in transgenen Mäusen. Milzzellen, die mit einem nicht

spezifischen Stimulator angeregt wurden, unterschieden sich aber in ihrer IFN- γ -Syntheseleistung nicht (Adamczewsky et al., 1991).

Die kaum unterscheidbaren IgG₁-Titer könnten Folge eines veränderten Zytokinprofils in den IgE-knock-in-Mäusen sein, z. B. in einer vermehrten IL-4-Produktion, wodurch das Fehlen eines IgG₁-Alleles kompensiert werden kann.

Ein weiterer Aspekt, den man nicht unberücksichtigt lassen darf, ist die Tatsache, daß nach Immunisierungen spezifische Antikörper gemessen werden. Diese entstehen „zufällig“ in einer oder wenigen Zellen. Die Zelle(n), deren Antikörper eine hohe Affinität zu dem Antigen haben, unterliegen anschließend an die Selektion einer drastischen Expansion, so daß anfängliche Unterschiede ausgeglichen werden.

Nach Reimmunisierung mit DNP-KLH und Alum konnten im Gegensatz zur Immunisierung mit OVA und IFA sowohl in WT- als auch in IgE-knock-in-Mäusen höhere IgE-Titer nachgewiesen werden. Dies belegt die Effizienz der Immunisierung, denn Vergleiche mit ähnlichen Experimenten ergaben größenordnungsmäßig gleiche Werte für endogenes IgE nach dieser Immunisierung (Yu et al., 1994).

Ursache für den Anstieg der IgE-Konzentration in WT- und IgE-knock-in-Mäusen dürfte das T_{H2}-Zytokin-Milieu sein, für das dieses Immunisierungsprotokoll verantwortlich zeichnet. T_{H2}-Zytokine (v. a. IL-4) fördern den Klassensprung zu IgE und IgG₁. Nach Reimmunisierung ließ sich bei den WT-Mäusen eine Verdopplung des IgE-Titers, bei den IgE-knock-in-Mäusen ein Anstieg auf das 5fache verzeichnen. Dies ist Ausdruck des vermehrten Klassensprunges zu IgG₁ und daraus folgender IgE-Produktion und weniger die Folge einer gesteigerten endogenen IgE-Produktion, denn sowohl WT- als auch IgE-knock-in-Mäuse verfügen über die beiden endogenen IgE-Allele.

Die vermehrte IgE-Produktion in mit DNP-KLH immunisierten IgE-knock-in-Mäusen konnten wir auch mittels FACS verifizieren. Bei den mit anti-B220 und anti-IgE angefärbten IgE-knock-in-Milzzellen waren 35 % der Zellen doppelt positiv. In den WT-Milzzellen konnten nur 3 % angefärbt werden. Dies ist Ausdruck einer niedrig affinen Bindung von IgE an CD23, denn nach Behandlung mit einem Säurepuffer konnte das IgE abgelöst werden. Schon 1983 erkannte Pruzansky den Einfluß von Säure auf die Bindung von IgE an seinen niedrig affinen Rezeptor CD23 (Pruzansky et al., 1983).

Bei Förderung des Klassensprunges zu IgG₁ durch dieses Immunisierungsprotokoll tritt auch kein großer Unterschied zwischen WT- und IgE-knock-in-Maus in der IgG₁-Produktion hervor. Es müssen also Mechanismen bestehen, die das Fehlen eines IgG₁-Alleles kompensieren und so die Transkription des verbliebenen IgG₁-Alleles fördern, z.B. IL-4.

Die weniger deutlichen Unterschiede in der IgG_{2a}-Produktion nach Immunisierung mit DNP-KLH und Alum könnten Folge des T_{H2}-Zytokin-Milieus sein. Durch verminderten Switch zu IgG_{2a}, dem typischen Immunglobulin einer T_{H1} dominierten Immunantwort, wird der Unterschied, dessen Entstehung ich bei der OVA-CFA-Immunisierung erläutert habe, weniger deutlich.

6. Anaphylaxie

Um die Auswirkung der erhöhten IgE-Produktion der IgE-knock-in-Mäuse in-vivo zu untersuchen, wurden zwei Verfahren durchgeführt. Zum einen die aktive kutane Anaphylaxie (ACA) und zum anderen die systemische Anaphylaxie (SA).

Ergebnisse der FACS-Experimente, die in den IgE-knock-in-Mäusen mehr Mastzellen und Basophile bzw. deren Vorläufer dedektieren konnten, ließen für die im Folgenden genannten Untersuchungen doch deutliche Unterschiede erwarten.

6.1. Aktive kutane Anaphylaxie (ACA)

Die aktive kutane Anaphylaxie ist dem Pricktest ähnlich, der in der klinischen Allergiediagnostik häufig verwendet wird. Bei der ACA wurde immunisierten Mäusen subcutan Antigen verabreicht. Nach systemischer i.v. Injektion von Farbstoff konnte das Ausmaß der Mastzelldegranulation anhand der Größe des Farbstoffaustrittes abgeschätzt werden.

Die Hautreaktion war jedoch in WT- und IgE-knock-in-Mäusen gleich stark. Für diese Beobachtungen gibt es zwei mögliche Erklärungen:

Obwohl in den WT-Mäusen signifikant weniger spezifisches IgE gemessen wurde, könnte noch eine für die ACA ausreichend große Menge IgE auf den Mastzellen vorhanden sein. Es ist bekannt, daß die Halbwertszeit von IgE, wenn es an den FcεRI

gebunden ist, mehrere Wochen betragen kann (Tada et al., 1975). Durch die relativ starke Stimulation der IgE-Produktion könnte ein großes Reservoir von antigenspezifischem IgE gebunden sein. Experimente über einen längeren Zeitraum (> 8 Wochen) nach der Immunisierung könnten möglicherweise Unterschiede zeigen.

Eine zweite mögliche Erklärung könnte sein, daß nicht nur spezifisches IgE, sondern auch andere Isotypen in der Lage sind, in dem verwendeten System eine Degranulation der Mastzellen zu bewirken. Ein Hinweis auf diese Möglichkeit sind IgE defiziente Mäuse, in denen man aktive Anaphylaxie induzieren kann (Oettgen et al., 1994). Der Mechanismus hierfür ist aber nicht geklärt.

Diese Art des Nachweises einer anaphylaktischen Reaktion hat ihren Vorteil in einer direkten Darstellung der durch die Mastzelldegranulation bedingten Veränderung der Gefäßpermeabilität. Allerdings scheint die Methode ungeeignet zu sein, geringe Unterschiede in der Mastzellaktivierbarkeit zu dedektieren.

6.2. Systemische Anaphylaxie

Die systemische Anaphylaxie induziert in immunisierten Mäusen nach i.v. Injektion von Antigen Symptome ähnlich der des anaphylaktischen Schocks des Menschen. Ein leicht zu messender Parameter ist die Körperkerntemperatur der Maus. Das Eintreten einer systemischen Anaphylaxie ist gekennzeichnet durch einen drastischen Abfall der Körpertemperatur (Matsuoka et al., 1999). Dabei ist der Temperaturabfall als Folge der Reaktionen des Körpers auf das Antigen aufzufassen, die mit dem Leben nicht mehr vereinbar sind.

Nach einmaliger Immunisierung mit geringen Mengen an Antigen (3 µg OVA an Alum präzipitiert i.p. und s.c.) scheinen die endogenen IgE-Allele wenig zu antigenspezifischen Antikörpern beizutragen. Der Temperaturverlauf von immunisierten WT- und unbehandelten Mäusen unterschied sich nicht. Nach systemischer Injektion von 500 µg Antigen zeigte sich in den IgE-knock-in-Mäusen ein stärkerer Körpertemperaturabfall, der auf verstärkte Mastzelldegranulation zurückzuführen ist. Dies wiederum ist die Folge der durch die genetische Veränderung gesteigerten IgE-Produktion und somit höherer Mastzell- bzw. Basophilenaktivität.

Zweimalige Immunisierung mit 100 µg OVA/CFA und Auslösung der Systemischen Anaphylaxie mit 500 µg OVA i.v. sieben Tage nach der letzten Immunisierung führte sowohl in WT- als auch in IgE-knock-in-Mäusen zum Abfall der Körpertemperatur auf 27,5°C. Dies ist Ausdruck einer fatalen Kreislaufreaktion. Durch die drastische Immunisierung ist vermutlich neben dem „knock-in“-IgE auch ausreichend viel endogenes IgE induziert worden, das sowohl in WT- als auch in IgE-knock-in-Mäusen durch die Degranulation der Mastzellen eine letale Menge an vasoaktiven Substanzen freigesetzt hat.

Nach Halbierung der Antigendosis, mit der die Systemische Anaphylaxie ausgelöst werden soll, fand man in beiden Gruppen einen Temperaturabfall, dessen Ausmaß Kreislaufreaktionen widerspiegelte, die mit dem Leben vereinbar waren. Die durchschnittlichen Werte der IgE-knock-in-Mäuse lagen 1°C unter denen der WT-Mäuse; ebenso zeigte sich ein verzögertes Wiedereinstellen der physiologischen Körpertemperatur. Dies ist Folge einer verstärkten Mastzelldegranulation in IgE-knock-in-Mäusen. Zum einen kann dies durch eine vermehrte Induktion der Mastzellen und zum anderen durch eine höhere Dichte von an FcεRI gebundenem IgE auf Mastzellen bedingt sein. Das Resultat ist in beiden Fällen identisch. Es kommt zu einer effektiveren Kreuzvernetzung des membrangebundenen IgE durch das Antigen. Gleiches gilt für die mit DNP-KLH immunisierten Mäuse, bei denen der maximale Temperaturunterschied 3°C betrug. Die IgE-knock-in-Mäuse näherten sich ebenfalls nur verzögert wieder ihrer Ausgangstemperatur an.

7. Zytokinprofil

Wie bereits in der Einleitung zu dieser Arbeit herausgestellt, sind bei der Allergieentstehung und Regulierung der Allergie eine Vielzahl von Botenstoffen, sog. Zytokine, erforderlich.

Es ist ein Ziel dieser Arbeit, bessere Einblicke in dieses komplexe Netzwerk zu erhalten. Wir konzentrierten unser Interesse auf die beiden „Hauptzytokine“ IFN-γ und IL-4; IFN-γ als Stellvertreter einer T_{H1} dominierten T-Zell-Population und IL-4 als

proallergisches Zytokin, das die Ausdifferenzierung zu T_{H2} -Zellen fördert und auch von diesen selbst synthetisiert wird.

Durch Experimente mit QPCR konnten keine Unterschiede im mRNA-Expressionsmuster von IFN- γ zwischen WT- und IgE-knock-in-Mäusen nachgewiesen werden. Wohl aber fand sich eine Induktion von IFN- γ -mRNA um den Faktor vier nach Immunisierung. Durch die experimentellen Bedingungen und aufgrund mitunter subjektiver Auswerteverfahren werden mit dieser Methode diskrete Unterschiede offensichtlich nicht evident.

Durch intrazelluläre FACS Analysen konnte in Milzzellen von immunisierten Mäusen Unterschiede ausgemacht werden. So waren von den nicht $CD4^+$ -Zellen der WT-Mäuse 2mal mehr, von den $CD4^+$ -Zellen 1,4mal mehr Zellen für IFN- γ positiv, im Vergleich zu IgE-knock-in-Milzzellen.

Die Stärke des intrazellulären FACS liegt in der Möglichkeit, einzelne Zellen auf ihre Eigenschaften hin zu untersuchen. Daß die angefärbten Zellen ihr Syntheseprodukt auch sezernieren, konnte durch den Zytokin-ELISA nachgewiesen werden, der ähnliche Ergebnisse wie die intrazelluläre FACS-Analyse erbrachte. Die in dem Zytokin-ELISA gemessenen Konzentrationen stimmen in der Größenordnung mit Werten vergleichbarer Experimente aus der Literatur überein (Oshiba et al., 1997).

Diese Beobachtung, ein Absinken der IFN- γ -Spiegel in IgE überexprimierenden Mäusen, machte auch Adamczewsky et al. (1991). Er vermutete eine defekte IFN- γ -Produktion in den transgenen Tieren. Nach unspezifischer Stimulation in-vitro war dieser Synthesedefekt nicht mehr nachzuweisen.

Die Ursache für diese Beobachtungen liegt in antigenspezifischem IgE. Oshiba et al. (1997) konnte an kultivierten Milzzellen von mit OVA immunisierten Mäusen folgendes erheben: die IFN- γ -Sekretion in OVA stimulierten Milzzellkulturen sinkt bei Anwesenheit von anti-OVA-IgE signifikant ab. Anti-OVA-IgG oder anti-TNP-IgE zeigten diesen Effekt nicht. Durch Zugabe von anti-CD23-Antikörper war der anti-OVA-IgE vermittelte Effekt aufzuheben.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der IL-4-QPCR, der intrazellulären FACS-Analyse und des ELISAs, die übereinstimmend in IgE-knock-in-Zellen eine geringere IL-4-Produktion nachweisen, könnte man annehmen, daß antigenspezifisches IgE auch auf

die IL-4-Sekretion einen negativen Einfluß hat. Diese Vermutung konnte Oshiba in seinen in-vitro-Experimenten nicht bestätigen.

Eine Erklärung könnte die Tatsache sein, daß IFN- γ die IL-4-Produktion unterdrückt (Pene et al., 1988). Seit kurzem gibt es Hinweise, daß Mastzellen neben vielen anderen Zytokinen auch IFN- γ sezernieren können (unveröffentlichte Daten von Hültner, Hämatologikum der GSF München). Durch nachgewiesene vermehrte Mastzellaktivität in IgE-knock-in-Mäusen und einer postulierten verstärkten IFN- γ -Produktion würden sich somit niedrigere Konzentrationen von IL-4 in IgE-knock-in-Mäusen erklären.

Allerdings müßte man dann höhere IFN- γ -Spiegel nachweisen können. Dieses Paradoxon fordert zu intensiverer Untersuchung des Zytokinexpressionsmusters auf. Einschränkend sollte klargestellt werden, daß das komplexe Netzwerk der Zytokininteraktionen offensichtlich nicht durch diese mechanistischen Überlegungen aufgeschlüsselt werden kann.

Abschließend muß beachtet werden, daß hier nicht untersuchte, bisher unbekannte und deshalb nicht meßbare Faktoren dieses Netzwerk nachhaltig beeinflussen, insbesondere müssen Mechanismen existieren, die die IL-4-Produktion der IgE-knock-in-Mäuse unterdrücken.

8. T-Zell-Antwort

Die FACS-Färbung gegen CD4 und CD25 erbrachte in IgE-knock-in-Mäusen eine Verdopplung der zweifach positiven Milzzellen. Dies impliziert eine verstärkte Aktivierung der T-Zellen (Lowenthal et al., 1985).

Die nachgewiesene vermehrte spezifische IgE-Produktion und verstärkte Mastzellaktivität läßt den Schluß zu, daß von Mastzellen bzw. Basophilen sezernierte Zytokine Wachstum, Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen nachhaltig beeinflussen können. Im Widerspruch dazu stehen unsere Zytokinanalysen ex-vivo, die in den IgE-knock-in-Mäusen vermindertes IL-4 und IFN- γ erkennen ließen. Dies sind aber nicht die einzigen Zytokine und Mediatoren, die von Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten ausgeschüttet werden (Galli, 1993). Somit könnten hier nicht

untersuchte Zytokine für die Veränderung der CD25/CD4⁺-Population in IgE-knock-in-Mäusen verantwortlich sein.

Die Untersuchung der CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zell-Populationen in Milz und Thymus erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und IgE-knock-in-Maus, so daß ein geringer Einfluß des vermehrt gebildeten IgE auf die CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen postuliert werden muß. Dies sind allerdings Oberflächenstrukturen, die nur eine grobe Einteilung der T-Zellen zulassen. Diffizilere Veränderungen der T-Zell-Populationen können mit dieser Färbung nicht nachgewiesen werden.

9. Nachweis einer IgE⁺/B220⁻-Zellpopulation

Die im Ergebnisteil (siehe S. 96) angesprochene Beobachtung einer IgE⁺-, aber B220⁻-Zellpopulation in mehrfach mit DNP-KLH immunisierten WT- und IgE-knock-in-Mäusen könnte eine Population der Memory-B-Zellen repräsentieren. Vor kurzem wurden zwei Arbeiten veröffentlicht, die diese Vermutung untermauern. Cascalho et al. (2000) fand eine Population mit membranständigem Immunglobulin, die negativ für B220 ist. Er konnte zeigen, daß die zellgebundenen Immunglobuline den Klassensprung vollzogen haben und Mutationen im Immunglobulingenlocus aufgetreten waren. Daraus folgerte er, daß die Zellen in eine Immunantwort involviert waren und schrieb diese Population den Memory B-Zellen zu. McHeyzer-Williams et al. (2000) rechnete in seiner Arbeit die B220⁻, membranständiges Immunglobulin tragende Zellpopulation ebenfalls zu den B-Gedächtniszellen. Diese Zellen können durch verschiedene Oberflächenstrukturen von den Antikörper sezernierenden (B220⁺) Gedächtniszellen unterschieden werden. So fehlt den B220⁻-Zellen der niedrig affine FcεRII (CD23). Dies konnten wir durch unsere Beobachtung ebenfalls bestätigen, denn die Behandlung der Milzzellen mit dem Stripping-Buffer, der IgE von CD23 ablöst, zeigte keinen Einfluß auf die IgE-Expression der Zellen.

Durch die Konstruktion des Targetvektors, bei dem bewußt die γ₁-Membranexons mitgeführt wurden, hätte man in IgE-knock-in-Mäusen vermehrt „membranständiges“ IgE erwartet. Da dies aber nicht der Fall war und auch bisher kaum Zellpopulationen mit mIgE dedektiert und genauer untersucht werden konnten, muß man eine strenge Regulation der Membranexpression von IgE postulieren.

Das Auftreten der B220-schwach-positiven-Population nach Behandlung mit dem Stripping-Buffer (pH 3,9!) dürfte aufgrund der durch Säure verursachten Zellschädigung entstanden sein (siehe Ergebnisse 2.6.2., Seite 96).

10. Eingriffsmöglichkeiten bei allergischen Erkrankungen

Die Versuche, die Pathogenese der Allergien zu verstehen, haben nicht nur theoretische, sondern auch praktische Bedeutung. Das höchste Ziel der Bestrebungen ist es, eine Möglichkeit zu finden, so in den Ablauf einer allergischen Reaktion einzugreifen, daß eine effektive Therapie möglich ist. Abb. 55 (Seite 119) zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Vorgänge, die zu allergischen Reaktionen führen, und einige Möglichkeiten, in diesen Ablauf einzugreifen.

Nur wenige dieser therapeutischen Möglichkeiten werden heute genutzt, und diese haben erhebliche Nachteile und Nebenwirkungen, so daß von einer Beherrschung der therapeutischen Situation nicht gesprochen werden kann. Die Vermeidung des Allergens setzt seine Identifizierung voraus und ist besonders bei Allergien gegen weit verbreitete Antigene wie Hausstaubmilben oder Grundnahrungsmittel schwer durchzuführen. Die medikamentösen Therapiemöglichkeiten können lediglich die Symptome lindern und haben dabei eine eingeschränkte Wirkungsbreite:

Antihistaminika haben keine Wirkung auf die Effekte, die von Leukotrienen verursacht werden. Steroide können zwar die späten, entzündlichen Symptome von Asthma mildern, haben aber bei chronischer systemischer Einnahme erhebliche Nebenwirkungen.

Die Hyposensibilisierungstherapie stellt den Versuch einer ursächlichen Therapie mit immunologischen Mitteln dar. Durch wiederholte Injektion von kleinen Dosen des Allergens wird versucht, das Immunsystem des Patienten so zu beeinflussen, daß es nicht mehr allergisch reagiert. Welche Vorgänge hierfür verantwortlich sind, ist noch nicht zur Gänze geklärt.

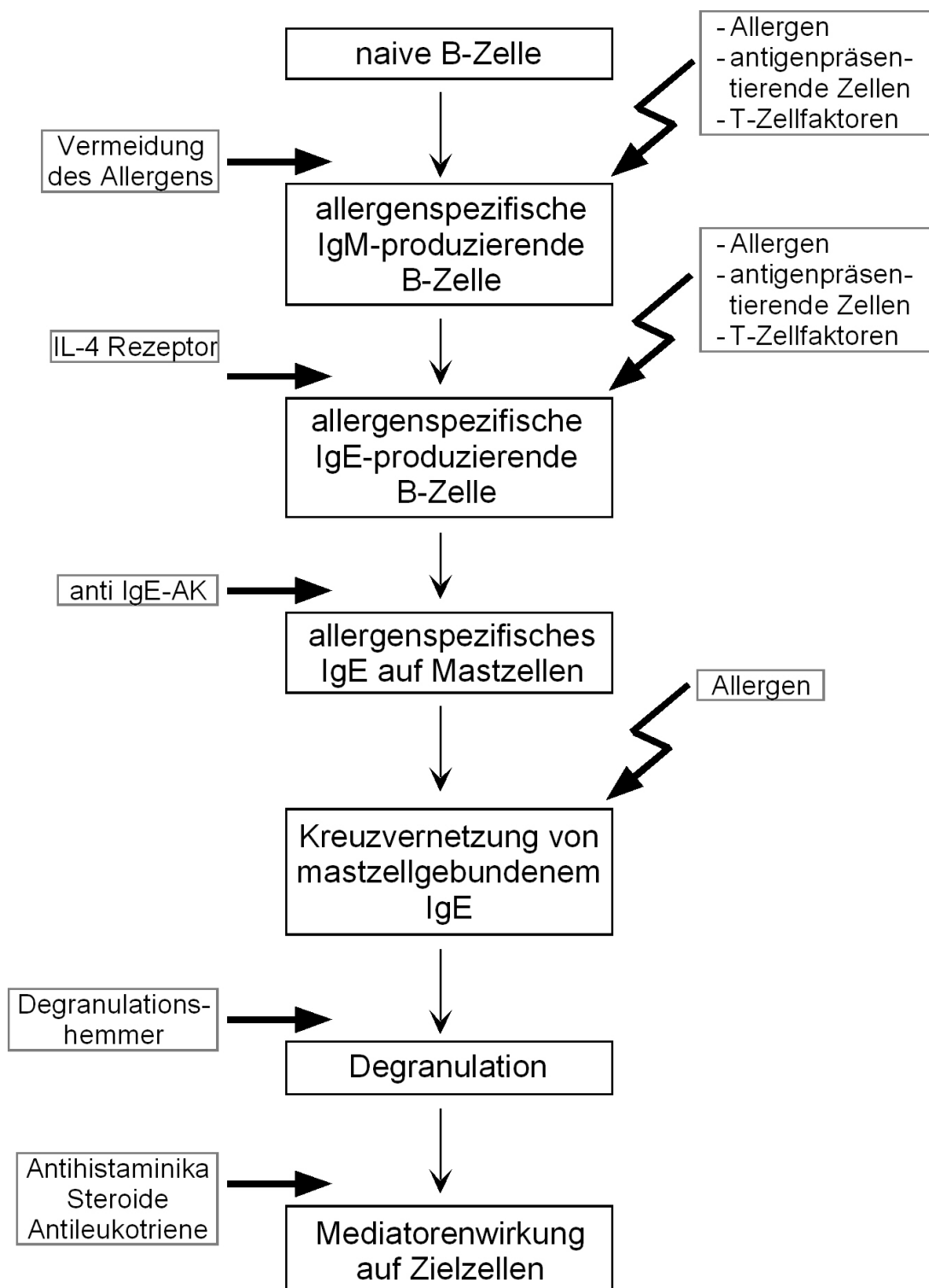


Abb. 55: Therapeutische Eingriffsmöglichkeiten bei Allergien [nach Adamczewski]

Diskutiert wurden anfangs ein echtes Toleranzphänomen und sogenannte blockierende Antikörper aus den IgG-Klassen, die mit IgE um das Allergen kompetitieren. Diese Vorstellungen können nicht mehr aufrecht erhalten werden. Seit einigen Jahren wird die Beeinflussung der T_H-Subpopulationen hin zur T_{H1} dominierten T-Zell-Antwort als Grund für den Erfolg der Immuntherapie angesehen (Bellinghausen et al., 1997; Biedermann et al., 1999). Neuere Erkenntnisse scheinen eine Involvierung einer weiteren T-Helferzell-Subpopulation, der Tr1-Zellen, zu belegen. Diese Zellen sind durch Sezernierung eines immunsuppressiven Zytokines (IL-10) charakterisiert (Akdis et al., 1999).

Nachfolgend möchte ich einen kleinen Auszug aus weiteren therapeutischen Möglichkeiten geben, die allerdings noch experimentell untersucht werden. So gibt es z. B. Versuche, die IgE produzierende B-Zellpopulation selektiv mit Antikörpern oder Immuntoxinen, die nur die Membranform des IgE-Antikörpers erkennen, zu zerstören (Chang et al., 1990). Weiterhin wird versucht, die Bindung von IgE an seinen FcεRI auf Mastzellen und Basophilen zu verhindern. Hierzu wurden rekombinante oder synthetische Fragmente des Fc-Teils des IgE-Moleküls (Geha et al., 1985; Helm et al., 1989) oder monoklonale Antikörper (rhuMAb-E25)(Corry et al. 1999; Milgram et al., 1999) untersucht.

Wie schon angedeutet, ist IL-4 maßgeblich an der Pathogenese allergischer Erkrankungen beteiligt. So existiert seit kurzem ein rekombinanter löslicher humaner IL-4 Rezeptor, mit dem IL-4 inaktiviert werden kann, bevor es an den zellgebundenen Rezeptor bindet und dort seine proallergische Wirkung entfaltet (Borish et al., 1999).

Weiterhin werden verschiedene Kinase-Inhibitoren, Transkriptionsfaktor-Inhibitoren, monoklonale Antikörper gegen andere Zytokine (IL-5, IL-13, TNF) und Chemokin-Inhibitoren untersucht (Barnes, 1999). Eine genaue und umfassende Darstellung der Wirkungsweise der eben aufgezählten Substanzen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

11. Vor- und Nachteile dieses Mausmodelles

Waren die IgE-Antikörper der bisher beschriebenen Mausmodelle, die die IgE-Überexpression als Strategie zur Untersuchung der Allergie verwendet haben, auf ein

bestimmtes Antigen beschränkt, so ist das hier vorgestellte Mausmodell in Bezug auf Quantität den transgenen Mausmodellen unterlegen, es können aber gegen unterschiedlichste Antigene spezifische IgE-Antikörper produziert werden.

Dies geschieht durch eine örtlich genau definierte Veränderung im Genom der Maus - ein gravierender Unterschied zu den bereits existierenden Mausmodellen. Somit können Effekte, die durch zufällige Integration des Transgenes in das Genom der Maus entstehen, eliminiert werden.

Weiters können durch einfache Verpaarung der heterozygoten Tiere Mäuse generiert werden, die zum einen die Fähigkeit, IgG₁ zu produzieren, verloren haben, aber dafür drastische Mengen an IgE synthetisieren können.

Ein weiterer Vorteil dieses Modells liegt in der Möglichkeit, mittels mehrmaligem Immunisieren mit dem gleichen Antigen durch sog. Somatische Hypermutation hochaffine IgE-Antikörper generieren zu können.

Um gut meßbare Mengen IgE zu erhalten, muß man die transgenen Mausmodelle mit großen Mengen von Antigen immunisieren. Unser IgE-knock-in bietet die Möglichkeit, auch durch geringe Antigenmengen relevante IgE-Titer zu bekommen, denn beim Menschen kann Allergie u.a. durch mehrmaligem Kontakt mit geringen Mengen an Antigen entstehen.

Schließlich kann dieses Mausmodell - besonders homozygote Tiere - dazu herangezogen werden, die postulierten protektiven Effekte von IgE bei Parasiteninfektionen genauer zu erforschen.

Als Nachteil dieses Modelles, aber auch vieler anderer Mausmodelle, muß die dramatische Veränderung im Genom der Maus erwähnt werden. Zwar wird bei Allergikern die Disposition, Allergien zu entwickeln, vererbt, eine genau definierte lokalisierbare Veränderung im menschlichen Erbgut gibt es hierfür aber nicht (Cookson, 1999).

Ein nicht zu umgehendes Problem liegt in der Tatsache, daß die Beobachtungen an Mäusen gemacht werden, die sich zwar als Modellorganismus für den Menschen zunehmender Beliebtheit erfreuen. Aber es bestehen doch gravierende Unterschiede. Hier ist besonders zu erwähnen, daß in der Maus Komponenten des allergischen Systems unterschiedlich exprimiert werden können (Denny et al., 2000).

Zudem muss an unseren Untersuchungen kritisiert werden, daß die Beobachtungen unter artifiziellen Bedingungen gemacht wurden. Dies schließt die Haltung der Tiere in einer „specific-pathogen-free“ (SPF) Umgebung und die Immunisierungen mit ein, die in diesem Ausmaß beim Menschen bei Entstehung einer Allergie keine bzw. eine untergeordnete Rolle spielen.

12. Ausblick

In der Zukunft ist die weitere Verpaarung der heterozygoten Tiere geplant, um einerseits den genetischen Hintergrund der C57/BL6- und 129/OLA-Mausstämme zu minimieren und um andererseits homozygote Mäuse zu erhalten.

Um den postulierten negativ regulatorischen Einfluß von CD23 auf die IgE-Synthese zu untersuchen, sollten die Mäuse mit CD23-knock-out-Mäusen verpaart werden (Yu et al., 1994).

Eine sehr wichtige Rolle bei Allergieentstehung spielt das Verhältnis der T_{H1}/T_{H2} -Zellen. „Das“ T_{H1} -Zytokin, das die Entstehung von T_{H2} -Zellen hemmt, ist IFN- γ . Interessant wäre somit die Kreuzung unserer Mäuse mit IFN- γ -knock-out-Mäusen (Dalton et al., 1993). Analog dazu könnte durch Verpaarung mit IL-4 defizienten Mäusen (Kühn et al., 1991) das Zusammenspiel von vermehrtem, antigen-spezifischem IgE und dem proallergischen Zytokin IL-4 besser beleuchtet werden.

Vermehrt gebildetes IgE kann seine Wirkung nur über Rezeptoren und hier vor allem durch den Fc ϵ RI entfalten. Von Interesse wäre deshalb eine Verpaarung der IgE-knock-in-Mäuse mit Fc ϵ RI-transgenen-Mäusen, um die verstärkte Wirkung von IgE untersuchen zu können (Dombrowicz et al., 1996).

E ZUSAMMENFASSUNG

Die hier vorliegende Arbeit stellt ein neues Mausmodell vor, mit dem der Einfluß von IgE in der Entstehung einer Allergie und die Folgen vermehrter IgE-Produktion in-vivo untersucht werden können. Erreicht wurde dies durch eine definierte Mutation im Erbgut von Mäusen. Mittels homologer Rekombination wurde durch ein knock-in-Verfahren eines der beiden γ_1 -Allele im Immunglobulingenlocus durch die Sequenz, die für den IgE-Isotyp codiert, ersetzt.

Vermehrte IgE-Expression in unbehandelten Mäusen

In acht Wochen alten, nicht immunisierten, heterozygoten IgE-knock-in-Mäusen fand man 5fach erhöhte IgE-Spiegel im Serum. Die anderen Ig-Klassen unterschieden sich nicht signifikant.

In-vitro-Stimulation

Nach In-vitro-Stimulation von Milzzellen mit LPS alleine produzierten die IgE-knock-in-Milzzellen bereits IgE. Dies belegt die Funktionalität der IgE-Expression unter den regulatorischen Elementen von IgG₁. In Abhängigkeit der IL-4-Konzentration zeigte sich eine stetige Zunahme der IgE-Spiegel.

WT-Milzzellen produzierten nur bei maximaler IL-4-Stimulation meßbare IgE-Titer, die etwa 15 % der von IgE-knock-in-Mäusen produzierten IgE-Titer ausmachten.

Immunisierungen mit zwei verschiedenen Antigenen

Die Immunisierungen mit OVA bzw. DNP-KLH als Antigen zeigten in Abhängigkeit der verwendeten Adjuvantien charakteristische Verläufe.

Immunisierung mit OVA/CFA führte zu 12mal mehr IgE, nach Reimmunisierung stieg der Unterschied auf 600fache IgE-Spiegel der IgE-knock-in-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen.

Durch Reimmunisierung mit DNP-KLH/Alum war ein Anstieg der IgE-Produktion der IgE-knock-in-Mäuse von anfänglich 12fach auf 32fach zu verzeichnen.

Der Unterschied der IgE-Titer zwischen WT und IgE-knock-in war nach Stimulation mit OVA/CFA deutlich ausgeprägter als nach Stimulation mit DNP-KLH/Alum.

Die IgG₁-Antworten zeigten bei beiden Immunisierungen zwischen WT- und IgE-knock-in-Mäusen keine Differenz.

Anaphylaktische Reaktionen

Aktive kutane Anaphylaxie: Die immunisierten Tiere reagierten in Abhängigkeit der injizierten Ag-Menge mit einer mastzelldegranulationsbedingten Hautreaktion. WT und IgE-knock-in konnten hierbei nicht diskriminiert werden.

Systemische Anaphylaxie: Durch Auslösung einer systemischen Anaphylaxie konnten Unterschiede festgestellt werden. IgE-knock-in-Mäuse zeigten deutlichere Kreislaufreaktionen.

Analyse des Zytokinprofiles (IFN- γ und IL-4)

Die Analyse des Zytokinprofiles mittels Quantitativer PCR (QPCR) erbrachte für IFN- γ keine Unterschiede zwischen WT- u. IgE-knock-in-Mäusen, die Produktion von IL-4-mRNA war in IgE-knock-in-Mäusen halb so groß wie in WT-Mäusen.

Durch intrazelluläre FACS-Analyse und mittels eines Zytokin-ELISAs konnte in IgE-knock-in-Mäusen eine verminderte Konzentration sowohl von IFN- γ als auch von IL-4 nachgewiesen werden.

FACS Untersuchungen verschiedener Oberflächenmarker

Unsere Experimente zeigten nach Immunisierung eine vermehrte Bildung von IgE, das an CD23 gebunden war. Weiters konnten in IgE-knock-in-Mäusen vermehrt Mastzellen und Basophile Granulozyten bzw. deren Vorläufer nachgewiesen werden. Ebenso fand man in IgE-knock-in-Mäusen vermehrt CD23⁺-Zellen im Knochenmark. Schließlich waren in Milzzellen von IgE-knock-in-Mäusen mehr aktivierte T-Helferzellen (CD4⁺/CD25⁺) zu detektieren.

Fazit:

Die von uns generierten und grundlegend analysierten heterozygoten IgE-knock-in-Mäuse stellen ein Modell dar, das einen Beitrag zum Verständnis der Regulation und Funktion von IgE liefert. In Zukunft kann diese Mauslinie durch Verpaarung z. B. mit FcεRI-transgenen-Mäusen oder mit CD23-defizienten-Mäusen eine weitere Rolle in der Analyse komplexer Wechselwirkungen von Komponenten des „allergischen Netzwerkes“ spielen. Zusätzlich ist geplant, durch verschiedene virale, parasitäre und bakterielle Infektionsmodelle die Vor- und Nachteile einer erhöhten IgE-Antwort auf den gesamten Organismus zu untersuchen.

Es bleibt zu hoffen, daß mit den Erkenntnissen, die durch weitere intensive Forschung auf dem Gebiet der Allergie erlangt werden - ein kleiner Baustein könnte die hier vorgestellte Mauslinie sein - ein großer Schritt hin zur kausalen Therapie von Allergien getan wird und somit eine Erkrankung, die immer mehr Menschen betrifft, besser therapiert oder geheilt werden kann.

F LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas, AK., Lichtmann, AH., Pober, JS. Cellular and molecular immunology – 3rd ed. W. B. Saunders Company 1997
2. Achatz, G., Nitschke, L., Lamers, M. (1997). Effect of Transmembrane and Cytoplasmic Domains of IgE on the IgE Response. *Science* 276: 409
3. Adamczewski, M., Köhler, G., Lamers, MC. (1991). Expression and biological effects of high levels of serum IgE in ε heavy chain transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* 21: 617
4. Akdis, CA., Blaser, K. (1999). IL-10 induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB J* 13:603
5. Allman, DM., Ferguson, SE., Cancro, MP. (1992). Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigen^{hi} and exhibit unique signaling characteristics. *J. Immunol.* 149: 2533
6. Ball, TM., Castro-Rodrigues, JA., Griffith, KA., Holberg, CJ., Martinez, FD., Wright, AL. (2000). Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N. Engl. J. Med.* 343: 538
7. Baniyash, M., Eshhar, Z. (1988). Inhibition of IgE binding to mast cells and basophils by monoclonal antibodies to murine IgE. *Eur. J. Immunol.* 14: 799
8. Barnes, JP., (1999). Therapeutic strategies for allergic diseases. *Nature* 402 Supp.: B18
9. Bellinghausen, I., Metz, G., Enk, AH., Christmann, S., Knop, J., Saloga, J. (1997). Insect venom immunotherapy induces IL-10 production and a Th2- to Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur. J. Immunol* 27: 1131
10. Biedermann, T., Röcken, M. (1999). Th1/Th2 balance in atopy. *Springer Semin. Immunopathol.* 21: 295
11. Birnboim, HC. (1983). A rapid alkaline extraktion method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100: 243
12. Birnboim, HC., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 151

13. Bjorksten, B. (1999). Allergy priming early in life. *Lancet* 353: 167
14. Bolivar F., Rodriguez, RL., Greene, PJ., Betlach, MC., Heyneker, HL., Boyer, HW. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95
15. Borish, LC., Nelson, HS., Lanz, MJ., Claussen, L., Whitmore, JB., Agosti, JM., Garrison, L. (1999). Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1816
16. Bouaboula, M., Legoux, P., Pessegue, B., Delpech, B., Dumont, X., Piechaczyk, M., Cassellas, P., Shire, D. (1992). Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving coamplification with a multispecific internal control. *J. Biol. Chem.* 267: 21830
17. Braun-Fahrlander, C., Gassner, M., Grize, L., Neu, U., Sennhauser, FH., Varonier, HS., Vuille, JC., Wuthrich, B. (1999). Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. *Clin. Exp. Allergy* 29: 28
18. Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., Lauener, R., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D., Mutius, E. (2002). Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* 347: 869
19. Brewer, JM., Conacher, M., Satoskar, A., Bluethmann, H., Alexander, J. (1996). In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur. J. Immunol.* 26: 2062
20. Burstein, HJ., Tepper, RI., Leder, P., Abbas, AK. (1991). Humoral immune functions in IL-4 transgenic mice. *J Immunol* 147: 2950
21. Capecchi, MR. (1994). Targeted gene replacement. *Sci. Am.* 270: 52
22. Carsetti, R., Köhler, G., Lamers, MC. (1995). Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J. Exp. Med.* 181: 2129
23. Cascalho, M., Wong, J., Brown, J., Jack, HM., Steinberg, C., Wabl, M. (2000). A B220(-), CD19(-) population of B cells in the peripheral blood of quasimonoclonal mice. *Int. Immunol.* 12: 29

24. Chang, TW., Davis, FM., Sun, NC., Sun, CR., MacGlashan, DW. Jr, Hamilton, RG. (1990). Monoclonal antibodies specific for human IgE-producing B cells: a potential therapeutic for IgE-mediated allergic diseases. *Biotechnology (N Y)* 8: 122
25. Chase, MW. (1979). Irreverent recollections from Cooke and Coca, 1928-1978. *J. Allergy Clin. Immunol.* 64: 306
26. Chiorazzi, N., Fox, DA., Katz, DH. (1977). Hapten-specific IgE antibody responses in mice. VII. Conversion of IgE “non-responder” strains to IgE “responders” by elimination of suppressor T cell activity. *J. Immunol.* 118: 48
27. Choi, IH., Shin, YM., Park, JS., Lee, MS., Han, EH., Chai, OH., Im, SY., Ha, TY., Lee, HK. (1998). Immunoglobulin E-dependent active fatal anaphylaxis in mast cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 188: 1587
28. Cooke, RA., Vander-Veer, A. (1916). Human sensitisation. *J. Immunol.* 1: 201
29. Cookson, W. (1999). The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 402 Supp.: B5
30. Coombs, RRA., Gell, PGH. (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. In: Gell, PGH., Coombs, RRA. (eds) *Clinical aspects of immunology*. Blackwell, Oxford, pp. 317-337
31. Corne, J., Djukanovic, R., Thomas, L., Warner, J., Botta, L., Grandordy, B., Gygax, D., Heusser, C., Patalano, F., Richardson, W., Kilchherr, E., Staehelin, T., Davis, F., Gordon, W., Sun, L., Liou, R., Wang, G., Chang, TW., Holgate, S. (1997). The effect of intravenous administration of a chimeric anti-IgE antibody on serum IgE levels in atopic subjects: efficacy, safety, and pharmacokinetics. *J. Clin. Invest.* 99: 879
32. Corry, DB., Gruning, G., Hadeiba, H., Kurup, VP., Warnock, ML., Sheppard, D., Rennick, DM., Locksley, RM. (1998). Requirements for allergen-induced airway hyperreactivity in T and B cell-deficient mice. *Mol. Med.* 4: 344
33. Corry, DB., Kheradmand, F. (1999). Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 402 Supp.: B18

34. Coyle, AJ., Tsuyuki, S., Bertrand, C., Huang, S., Aguet, M., Alkan, SS., Anderson, GP. (1996). Mice lacking the IFN-gamma receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J. Immunol.* 156: 2680
35. Dalton, DK., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, IS., Bradley, A., Stewart, TA. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259: 1739
36. Denny, P., Justice, MJ. (2000). Mouse as the measure of man? *TIG* 16: 283
37. Dinkel, A., Aicher, WK., Warnatz, K., Burki, K., Eibel, H., Ledermann, B. (1999) Efficient generation of transgenic BALB/c mice using BALB/c embryonic stem cells. *J. Immunol. Methods* 223: 255
38. Dombrowicz, D., Brini, AT., Flamand, V., Hicks, E., Snouwaert, JN., Kinet, JP., Koller, BH. (1996). Anaphylaxis mediated through a humanized high affinity IgE receptor. *J. Immunol.* 157: 1645
39. Dombrowicz, D., Flamand, V., Brigman, KK., Koller, BH., Kinet, JP. (1993). Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell* 75: 969
40. Douek, IF., Leech, NJ., Gillmor, HA., Bingley, PJ., Gale, EA. (1999). Children with type-1 diabetes and their unaffected siblings have fewer symptoms of asthma. *Lancet* 353: 1850
41. Erb, KJ., Holloway, JW., Sobeck, A., Moll, H., Le Gros, G. (1998). Infection of mice with Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette-Guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J. Exp. Med.* 187: 561
42. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg – Berlin – Oxford, 1996
43. Galli, SJ. (1993). New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 328: 257
44. Geha, RS., Helm, B., Gould, H. (1985) Inhibition of the Prausnitz-Kustner reaction by an immunoglobulin epsilon-chain fragment synthesized in E. coli. *Nature* 315: 577

45. Goldsby, RA. , Kindt, TJ., Osborne, BA. Kuby immunology, 4th ed 2000, W. H. Freeman and Company
46. Gu, H., Marth, JD., Orban, PC., Mossmann, H., Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265: 103
47. Gu, H., Zou, YR., Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced trough Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73: 1155
48. Hamilton, DL., Abremski, K. (1984). Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J. Mol. Biol.* 178: 481
49. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557
50. Helm, B., Kebo, D., Vercelli, D., Glovsky, MM., Gould, H., Ishizaka, K., Geha, R., Ishizaka, T. (1989). Blocking of passive sensitization of human mast cells and basophil granulocytes with IgE antibodies by a recombinant human epsilon-chain fragment of 76 amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 9465
51. Hoess, RH., Abremski, K. (1985). Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site specific recombination system. *J. Mol. Biol.* 181: 351
52. Hoess, RH., Wierzbicki, A., Abremski, K. (1986). The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6840
53. Hogan, SP., Mould, A., Kikutani, H., Ramsay, AJ., Foster, PS. (1997). Aeroallergen-induced eosinophilic inflammation, lung damage, and airways hyperreactivity in mice can occur independently of IL-4 and allergen-specific imunoglobulins. *J. Clin. Invest.* 99: 1329
54. Holgate, ST. (1999). The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 402 Supp.: B2
55. Holt, PG., Macaubas, C., Stumbles, PA., Sly, PD. (1999). The role of Allergy in the development of asthma. *Nature* 402 Supp.: B12
56. Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326: 292

57. Hou, J., Schindler, U., Henzel, WJ., Ho, TC., Brasseur, M., McKnight, SL. (1994). An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 265: 1701
58. Imanishi-Kari, T., Huang, CA., Iacomini, J., Yannoutsos, N. (1993). Endogenous Ig production in mu transgenic mice. II. Anti-Ig reactivity and apparent double allotype expression. *J. Immunol.* 150: 3327
59. Ishida, N., Ueda, S., Hayashida, H., Miyata, T., Honjo, T. (1982). The nucleotide sequence of the mouse immunoglobulin epsilon gene: comparison with the human epsilon gene sequence. *EMBO J* 1: 1117
60. Ishizaka, K., Ishizaka, T., Hornbrook, MM. (1966) Physiochemical properties of reginic antibody. V. Correlation of reginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J. immunol.* 97: 840
61. Jung, S., Rajewsky, K., Radbruch, A. (1993). Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* 259: 984
62. Jung, T., Schauer, C., Heusser, C., Neumann, C., Rieger, C. (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 159: 197
63. Kaisho, T., Schwenk, F., Rajewsky, K. (1997). The roles of $\gamma 1$ Heavy Chain Membrane Expression and Cytoplasmic Tail in IgG1 Responses. *Science* 276: 412
64. Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357: 1076
65. Katayama, NJ., Shih, JP., Nishikawa, SI., Kina, T., Clark, SC., Ogawa, M. (1993). Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors. *Blood* 82: 2353
66. Kopf, M., Brombacher, F., Köhler, G., Kienzle, G., Widmann, KH., Lefrang, K., Humborg, C., Ledermann, B., Solbach, W. (1996). IL-4-deficient BALB/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 184: 1127
67. Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, MC., Bluethmann, H., Köhler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362: 245

68. Kramer, U., Heinrich, J., Wjst, M., Wichmann, HE. (1999). Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet* 353: 450
69. Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254: 707
70. Kühn, R., Schwenk, F. (1997) Advances in gene targeting methods. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 183
71. Laird, PW., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, MA., Jaenisch, R. Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic. Acids. Res.* 19: 4293
72. Lantz, CS., Yamaguchi, M., Oettgen, HC., Katona, IM., Miyajima, I., Kinet, JP., Galli, SJ. (1997). IgE regulates mouse basophil Fc epsilon RI expression in vivo. *J. Immunol.* 158: 2517
73. Le Gros, G., Ben-Sasson, SZ., Seder, R., Finkelman, FD., Paul, WE. (1990). Generation of interleukin-4 (IL-4)-producing cells in vitro and in vivo: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4 producing cells. *J. Exp. Med.* 172: 921
74. Ledermann, B., Burki, K. (1991). Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line. *Exp. Cell Res.* 197: 254
75. Lee, SC., Jaffar, ZH., Wan, KS., Holgate, ST., Roberts, K. (1999). Regulation of Pulmonary T-cell responses to inhaled antigen: role in Th1 - and Th2-mediated inflammation. *J. Immunol.* 162: 6867
76. Lee, WT., Rao, M., Conrad, DH. (1987). The murine lymphocyte receptor for IgE. IV. The mechanism of ligand-specific receptor upregulation on B-cells. *J. Immunol.* 139: 1191
77. Lefranc, MP., Hammarstrom, L., Smith, CI., Lefranc, G. (1991). Gene deletions in the human immunoglobulin heavy chains constant region locus: molecular and immunological analysis. *Immunodef. Rev.* 2: 265
78. Lisitsyn, N., Wigler, M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259: 946
79. Lobe, CG., Nagy, A. (1998) Conditional genome alteration in mice. *BioEssays* 20: 200

80. Loken, MR., Herzenber, LA. (1975). Analysis of cell populations with a fluorescenc-activated cell sorter. *Ann. NY Acad. Sci.* 254: 163
81. Lowenthal, JW., Zubler, RH., Nabholz, M., MacDonald, HR. (1985). Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes. *Nature* 315: 669
82. Mansour, SL., Thomas, KR., Capecchi, MR. (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336: 348
83. Matsuoka, K., Taya, C., Kubo, S., Toyama-Sorimachi, N., Kitamura, F., Ra, C., Yonekawa, H., Karasuyama, H. (1999). Establishment of antigen-specific IgE transgenic mice to study pathological and immunobiological roles of IgE in vivo. *Int. Immunology* 11: 987
84. McHeyzer-Williams, LJ., Cool, M., McHeyzer-Williams, MG. (2000). Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel B220(-) memory b cell compartment. *J. Exp. Med.* 191: 1149
85. Migone, N., Oliviero, S., de Lange, G., Delacroix, DL., Boschis, D., Altruda, F., Silengo, L., DeMarchi, M., Carbonara, AO. (1984). Multiple gene deletions within the human immunoglobulin heavy-chain cluster. *Proc. Natl. Sci. USA* 81: 5811
86. Milgrom, H., Fick, RB., Su, JQ., Reimann, JD., Bush, RK., Watrous, ML., Metzger, WJ. (1999). Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAb-E25 Study Group. *N. Engl. J. Med.* 341: 1966
87. Miyajima, I., Dombrowicz, D., Martin, TR., Ravetch, JV., Kinet, JP., Galli, SJ. (1997). Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* 99: 901
88. Mosman, TR., Coffman, RL. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348
89. Mosmann, TR., Cherwinski, H., Bond, MW., Giedlin, MA., Coffman, RL. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definiton according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348

90. Munzo, J. et al. (1981). Biological activities of crystalline pertussigen from *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 3: 820
91. Noben-Trauth, N., Kohler, G., Burki, K., Ledermann, B. (1996). Efficient targeting of the IL-4 gene in a BALB/c embryonic stem cell line. *Transgenic. Res.* 6: 487
92. Nowak, D., Volmer, T., Wettengel, R. (1996). Asthma bronchiale - eine Krankheitskostenanalyse. *Pneumologie* 50: 364
93. Oettgen, HC., Martin, TR., Wynshaw-Boris, A., Deng, C., Drazen, JM., Leder, P. (1994). Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature* 370: 367
94. Orban, PC., Chul, D., Marth, JD. (1992). Tissue - and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6861
95. Oro, AS., Guarino, TJ., Driver, R., Steinman, L., Umetsu, DT. (1996). Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE-mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 97: 1402
96. Ortega, RG., Robb, RJ., Shevach, EM., Malek, TR. (1984). The murine IL-2 receptor.I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *J. Immunol.* 133: 1970
97. Oshiba, A., Hamelmann, E., Haczku, A., Takeda, K., Conrad, DH., Kikutani, H., Gelfand, EW. (1997). Modulation of antigen-induced B and T cell responses by antigen-specific IgE antibodies. *J. Immunol.* 159: 4056
98. Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Bonnefoy, JY., Spits, H., Yokota, T., Arai, N., Arai, K., Banchereau, J., et al. (1988). IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6880
99. Prausnitz, C., Küstner, H. (1921). Studien über die Überempfindlichkeit. *Zentralbl. Bakteriologie* 86: 160
100. Pretolani, M, Goldman, M. (1997). Cytokines involved in the downregulation of allergic airway inflammation. *Res. Immunol.* 148: 33
101. Prussin, C., Metcalfe, D. (1995). Detection of intracytoplasmatic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Meth.* 188: 117

102. Pruzansky, JJ., Grammer, LC., Patterson, R., Roberts, M. (1983). Dissociation of IgE from receptors on human basophils. *J. Immunol.* 131: 1949
103. Quelle, FW., Shimoda, K., Thierfelder, W., Fischer, C., Kim, A., Ruben, SM., Cleveland, JL., Pierce, JH., Keegan, AD., Nelms, K. (1995). Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-13 but are not required for mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 15(6): 3336
104. Rajewski, K. (1992). A phenotype or not: targeting genes in the immune system. *Science* 256: 485
105. Rajewsky, K., Gu, H., Kühn, R., Betz, UA., Müller, W., Roes, J., Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting. *J. Clin. Invest.* 98: 600
106. Ravetch, JV. Luster, AD., Weinshank, R., Kochan, J., Pavlovic, A., Portnoy, DA., Hulmes, J., Pan, YC., Unkeless, JC. (1986). Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science* 234: 718
107. Rodewald, HR., Dessing, M., Dvorak, AM., Galli, SJ. (1996). Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science* 271: 818
108. Roth, PE., Doglio, L., Manz, JT., Kim, JY., Lo, D., Storb, U. (1993). Immunoglobulin gamma 2b transgenes inhibit heavy chain gene rearrangement, but cannot promote B cell development. *J. Exp. Med.* 178: 2007
109. Saiki, RK, Gelfand, DH., Stoffel, S., Scharf, SJ., Higuchi, R., Horn, GT., Mullis, KB., Erlich, HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487
110. Sampson, HA. (1990). Pathogenesis of eczema. *Clin. Exp. Allergy.* 20: 459
111. Sauer, B. (1998). Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/lox System. *Methods* 14: 381
112. Sauer, B., Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5166
113. Sauer, B., Henderson, N. (1989). Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic. Acids. Res.* 17: 147

114. Sawai, S., Shimono, A., Hanaoka, K., Kondoh, H. (1991). Embryonic lethality resulting from disruption of both N-myc alleles in mouse zygotes. *New. Biol.* 3: 861
115. Schultz-Larsen, F. (1993). A genetic-epidemiologic study in a population based twin sample. *J. Am. Acad. Dermatol.* 28: 719
116. Schwenk, F., Baron, U., Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic. Acids. Res.* 23: 5080
117. Shimizu, A., Takahashi, N., Yamawaki-Kataoka, Y., Nishida, Y., Kataoka, T., Honjo, T. (1981). Ordering of mouse immunoglobulin heavy chain genes by molecular cloning. *Nature* 289: 149
118. Shirakawa, T., Enomoto, T., Shimazu, S., Hopkin, JM. (1997). The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 275: 77
119. Smith, AG., Heath, JK., Donaldson, DD., Wong, GG., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336: 688
120. Snapper, CM., Finkelman, FD., Paul, WE. (1988). Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J. Exp. Med.* 167: 183
121. Snapper, CM., Paul, WE. (1987). B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 139: 10
122. Southern, EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503
123. Strachan, DP. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299: 1259
124. Strachan, DP. (2000). Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 55: Suppl 1: 2
125. Tada, T., Okumura, K., Platteau, B., Beckers, A., Bazin, H. (1975). Half-lives of two types of rat homocytotropic antibodies in circulation and in the skin. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 48: 116
126. Tang, ML., Kemp, AS., Thorburn, J., Hill, DJ. (1994). Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 344: 983

127. Taylor, G., Walker, J. (1973). Charles Harrison Blackley, 1820-1900. *Clin Allergy* 3: 103
128. Thomas, KR., Capecchi, MR. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51: 503
129. Unkeless, JC. (1979). Characterization of a monoclonal antibody against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J. Exp. Med.* 150: 580
130. Valent, P. (1994). The riddle of the mast cell: kit (CD117)-ligand as the missing link? *Immunol. Today* 15: 111
131. Viera, P., Rajewsky, K. (1988). The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur. J. Immunol.* 18: 313
132. Von Mutius, E., Fritzsche, C., Weiland, SK., Roll, G., Magnussen, H. (1992). Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ* 305: 1395
133. Von Mutius, E., Martinez, FD., Fritzsche, C., Nicolai, T., Reitmeir, P., Thiemann, HH. (1994). Skin test reactivity and numbers of siblings. *BMJ* 308: 692
134. Von Pirquet, C. (1978). Allergy (von 24.7.1906). *MMW Muench. Med. Wochenschr.* 120: 474
135. Wahl, GM., Stern, M., Stark, GR. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3683
136. Weiss, S., (2002). Eat dirt - the hygiene hypothesis and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* 347: 930
137. Williams, CM., Galli, SJ. (2000). Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J. Exp. Med.* 192: 455
138. Williams, RL., Hilton, DJ., Pease, S., Willson, TA., Stewart, CL., Gearing, DP., Wagner, EF., Metcalf, D., Nicola, NA., Gough, NM. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336: 684

139. Yu, P., Kosco-Vilbois, M., Richards, M., Köhler, G., Lamers, MC., (1994) Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* 369: 753
140. Zenner, HP. (1987). Retrospect and perspective in rhinologic allergology. *HNO* 8: 315
141. Zsebo, KM., Williams, DA., Geissler, EN., Broudy, VC., Martin, FH., Atkins, HL., Hsu, RY., Birkett, NC., Okino, KH., Murdock, DC., Jacobsen, FW., Langley, KE., Smith, KA., Takeishi, T., Cattanch, BM., Galli, SJ., Suggs, SV. (1990). Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63: 213
142. Zweiman, B. (1993). The late-phase reaktion: role of IgE, its receptor and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 950

G DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie der Universität München bedanken, die zum erfolgreichen Abschluß dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Gert Riethmüller für die Arbeitsmöglichkeit im Institut für Immunologie der Universität München
- Herrn Dr. rer. nat. Philipp Yu für die Stellung des Themas, die freundliche und eingehende Betreuung und die immerwährende Diskussionsbereitschaft
- der DFG für die Finanzierung dieses Projektes
- meinem Mitdoktorand Herrn Robert Kras und Frau Anna Kollar für die mir stets gewährte Unterstützung
- Herrn Eugen Kopp für seine wertvollen technischen Tips
- Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer und seinen Mitarbeitern an der GSF Neuherberg insbesondere Frau Ulrike Huffstadt für die Blastozysteninjektion
- Frau Andrea Bol für die exzellente Betreuung des Tierstalls

H LEBENSLAUF

| | |
|---------------|--|
| 30.07.1976 | geboren in Bad Reichenhall als erstes von zwei Kindern der Eltern Max Lorenz und Gertrud Stöberl, geb. Lichtmanegger |
| 09/82 - 07/86 | Volksschule in Piding |
| 09/86 - 06/95 | Karlsgymnasium Bad Reichenhall |
| 30.06.1995 | Allgemeine Hochschulreife |
| 07/95 - 08/96 | Zivildienst beim Bayerischen Roten Kreuz, Kreisverband Berchtesgadener Land, Tätigkeit im Rettungsdienst |
| 11/96 - 10/02 | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 08.10.2002 | Ärztliche Prüfung |
| ab 01/03 | Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Inneren Abteilung I des Städtischen Krankenhauses Bad Reichenhall |